

Candida albicans 바이오필름 형성에
세균의 존재가 미치는 영향

연세대학교 대학원
의 학 과
한 경 희

Candida albicans 바이오필름 형성에
세균의 존재가 미치는 영향

지도교수 최 선 주

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2012 년 7 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

한 경 회

한경희의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2012 년 7 월 일

감사의 글

7년이라는 긴 시간, 정말로 다사다난했습니다. 그 중 2년여 동안 열심히 준비한 이 논문으로 저의 치열했던 30대 후반이 기억될 것 같습니다.

그 긴 시간을 함께 고민하며 연구를 지도해 주시고 논문이 완성 되도록 도와 주신 미생물학 교실 최선주 교수님께 깊이 감사를 드립니다. 자문을 맡아 주시고 관심 어린 조언을 해주신 미생물학 교실 이경호 교수님, 박주영 학장님, 내과학 교실 김효열 교수님께 감사를 드립니다. 자문위원 & 산부인과 과장님 & 의국 선배님으로 이끌어주시고 잡아주신 최성진 교수님, 정말 감사합니다.

또, 이번 실험이 미생물학 교실 선생님들의 도움이 절대적으로 중요했음을 밝히며, 특히 박수정 조교 선생님께 감사의 마음을 드립니다.

제가 산부인과를 전공으로 택한 12년 동안 저를 가르쳐 주신 산부인과학교실 차동수 교수님, 한혁동 교수님, 이영진 교수님, 정인배 교수님과 저를 관심으로 지켜주시는 병리학 교실 정순희 교수님, 마취과학 교실 엄대자 교수님께도 감사를 드립니다. 든든한 후배이자 동료교수인 박은영 교수에게도 수고했다는 인사를 하고 싶고, 박철중 전공의와 백미경, 박미화, 박미선, 장선희, 김민지 PA 선생님들도 고맙습니다.

항상 저를 도와주시고 격려해주시는 부모님께 진심으로 감사를 드립니다. 장녀라는 특혜로 제가 하는 일을 모두 ‘첫’ 경사로 자랑스러워 하시는 부모님, 늘 건강하시길 바랍니다. 또 멀리서 저를 응원해 주시는 시아버님과 도련님, 숙부님, 숙모님 내외분께도 감사를 드립니다. 제가 바쁜 동안 열심히 조카를 챙겨주고 응원해주는 친구 같은 동생 수경이와 제부 원에게도 고맙다는 인사를 하고 싶습니다.

제가 가장 사랑하는 두 최씨 남자인 남편과 아들 병찬이와 이 기쁨을 같이 하고 싶습니다.

늘 지켜주시고, 인도하시는 하나님께 이 모든 감사를 올려 드립니다.

2012 년 7 월 저자 씀

차 례

그림 및 표 차례	iii
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 실험 균주	7
2. 균주 배양	7
3. 바이오필름 생성	7
1) 96-well microtiter plate	7
2) 요카테터	8
4. 주사전자현미경	9
5. 바이오필름 관련 유전자의 발현	9
6. 통계학적 분석	11
III. 결과	12
1. 세균의 바이오필름 형성	12
2. 단독 균주 배양과 복합 균주 배양에서의 바이오필름 형성 비교	14
3. <i>C. albicans</i> 와 세균의 복합 균주 배양이 <i>C. albicans</i> 바이오필름 형성에 미치는 영향	15
4. <i>C. albicans</i> 와 사균의 복합 균주 배양이 <i>C. albicans</i> 바이오필름 형성에 미치는 영향	18
5. 세균의 바이오필름 형성에 죽은 <i>C. albicans</i> 가 미치는 영향	21
6. 단독 균주 배양과 복합 균주 배양에서 형성된 바이오필름의 구조	24
7. 유전자 발현 분석	29
1) <i>C. albicans</i> 바이오필름 형성 시 관련 유전자 발현	29
2) <i>C. albicans</i> 와 세균의 복합 균주 배양 시 유전자 발현 ...	31
3) <i>C. albicans</i> 와 사균의 복합 균주 배양 시 유전자 발현 ...	39

8. 요카테터 적용	39
1) 요카테터의 주사전자현미경 관찰 상	39
2) 요카테터에서 <i>C. albicans</i> 단독 배양 시 바이오필름 형성	40
3) 요카테터에서 <i>C. albicans</i> 와 세균과의 복합 균주 배양 시 바이오필름 형성	43
4) 요카테터에서 <i>C. albicans</i> 단독, 혹은 <i>C. albicans</i> 와 세균과의 복합 균주 배양 시 바이오필름의 구조	52
IV. 고찰	53
V. 결론	62
참고문헌	63
영문요약	68

그림 및 표 차례

Table 1.	Primers used for real-time RT-PCR	11
Table 2.	Biofilm formation on different strains of <i>C. albicans</i>	14
Fig. 1.	Biofilm formation on different bacteria	13
Fig. 2.	Effects of live bacteria presence on biofilm formation of <i>C. albicans</i>	16
Fig. 3.	Effects of dead bacteria presence on biofilm formation of <i>C. albicans</i>	19
Fig. 4.	Effects of dead <i>C. albicans</i> presence on biofilm formation of live bacteria	22
Fig. 5.	Scanning electron microscope images of biofilm formation...	25
Fig. 6.	Scanning electron microscope images of biofilm formation...	27
Fig. 7.	Relative quantitation of <i>SAP5</i> , <i>ALS3</i> , <i>ECE1</i> , <i>HWP1</i> gene expressions	30
Fig. 8.	Effect of live bacteria presence on expression of hyphae related gene on <i>C. albicans</i>	32
Fig. 9.	Effect of dead bacteria presence on expression of hyphae related gene on <i>C. albicans</i>	36
Fig. 10.	Scanning electron microscope images on indicated catheter materials inside	39
Fig. 11.	Biofilm formation of <i>C. albicans</i> at different catheter materials	41

Fig. 12.	Effect of live and dead <i>E. coli</i> presence on biofilm formation of <i>C. albicans</i> at different catheter materials	46
Fig. 13.	Effect of live and dead <i>P. aeruginosa</i> presence on biofilm formation of <i>C. albicans</i> at different catheter materials	...	47
Fig. 14.	Effect of live and dead <i>P. vulgaris</i> presence on biofilm formation of <i>C. albicans</i> at different catheter materials	...	48
Fig. 15.	Effect of live and dead <i>S. aureus</i> presence on biofilm formation of <i>C. albicans</i> at different catheter materials	...	49
Fig. 16.	Effect of live and dead <i>S. pyogenes</i> presence on biofilm formation of <i>C. albicans</i> at different catheter materials	...	50
Fig. 17.	Effect of live and dead <i>S. salivarius</i> presence on biofilm formation of <i>C. albicans</i> at different catheter materials	...	51

Candida albicans 바이오필름 형성에

세균의 존재가 미치는 영향

바이오필름 (biofilm)은 미생물들이 여러 외부 물질로 둘러싸인 구조로 생체 또는 무생물 표면에 형성될 수 있어 인체 내 지속 감염이나 삽입 의료 기구 관련 감염의 주 원인이 된다. 임상적으로 바이오필름 감염은 진균과 세균이 동시에 존재하는 복합 균주 감염 (polymicrobial disease)으로 알려져 있다.

Candida albicans (*C. albicans*)는 두형태성 진균으로 건강한 사람의 점막에 정상적으로 서식하는 편리공생균이나 면역이 저하된 사람에게는 기회 감염을 유발 할 수 있으며 최근 병원 내 감염의 주 원인균 중 하나로 주목을 받고 있다. 따라서 *C. albicans*의 발병력 인자 (virulence factor)인 바이오필름 형성에 다른 세균이 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. 이를 위해 *C. albicans*와 각각 세균의 단독 바이오필름 형성과 *C. albicans*와 세균의 복합 균주 배양시 바이오필름 형성을 확인하였고 열처리로 죽인 사균으로도 복합 균주 배양을 하였다. 바이오필름 구조를 주사전자현미경으로 관찰을 하였고 *C. albicans*의 세포 부착과 균사 형성에 관련된 유전자 (*SAP5*, *ALS3*, *ECE1*, *HWPI*) 발현 분석을 위해 real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)을 시행하였다. 또 실제 임상에 사용하는 삽입 의료 기구인 요카테터에도 적용해서 각 재질 간 *C. albicans* 단독 바이오필름 형성과 *C. albicans*와 세균의 복합 균주 배양 시 바이오필름 형성능을 측정하였고 주사전자현미경 관찰을 하였다.

바이오필름 형성능력이 낮은 *C. albicans* 와 높은 *C. albicans* 모두 다른 세균과 함께 배양한 경우 *C. albicans* 단독 배양한 것에 비해 바이오필름 형성이 저하되는 것을 확인하였다. *C. albicans* 를 사균체과 함께 배양해도 *C. albicans* 의 바이오필름 형성이 감소되는 것을 관찰하였다. *C. albicans* 와 세균을 함께 배양한 경우 형성된 바이오필름을 주사전자현미경으로 관찰하였을 때 *C. albicans* 사이 사이에 세균이 끼어있는 형태를 보이고 두께가 얇으며 밀집도가 낮고 현저히 균사체가 감소되었다. *C. albicans* 와 다른 세균을 함께 24 시간 배양한 경우 *SAP5*, *ALS3*, *ECE1*, *HWP1* 발현이 감소하였다.

결론적으로 세균은 *C. albicans* 의 바이오필름 형성을 저해하며 이 기전은 세균이 *C. albicans* 의 균사체 형성에 관계하는 유전자 발현을 억제하며, 세균체가 *C. albicans* 의 바이오필름 발달 과정 중 물리적으로 구조 형성을 억제하는 것으로 사료된다. 실제 임상에서 사용하는 요카테터에 같은 실험을 했을 때 plate 와 동일하게 6 종의 세균 모두 *C. albicans* 의 바이오필름 형성을 억제하였고 생균이 사균보다 억제효과가 더 큰 것으로 나타났다. 요카테터 재질 간 비교 시에는 silicone 재질이 가장 바이오필름 형성이 적었다. 따라서 감염 측면에서 보자면 다른 재질보다 silicone 재질의 요카테터를 선택하는 것이 바람직하다고 사료된다.

핵심되는 말 : *Candida albicans*, 바이오필름, 세균과의 관계, 요카테터

Candida albicans 바이오필름 형성에 세균의 존재가 미치는 영향

<지도교수 최 선 주>

연세대학교 대학원 의학과

한 경 희

I. 서론

바이오필름 (biofilm)은 미생물의 군집이 여러 외부 물질로 둘러싸인 구조로 생체 또는 무생물 표면에 형성될 수 있다.¹ 자연환경에서 세균과 진균은 대체로 필수 영양소의 가용 여부 등 환경조건에 따라 플랑크톤 (free-living)상태와 고착상태를 변환하며 살아간다. 고착상태의 미생물은 바이오필름을 형성하게 되고, 이는 인체 내 지속 감염이나 삽입 의료 기구 관련 감염과 연관된다.² 바이오필름에서 주로 발견되는 병원 내 감염 진균으로는 *Candida albicans* (*C. albicans*)가 가장 흔하다.³

C. albicans 는 두형태성 (dimorphism) 진균으로 건강한 사람의 구강, 장, 질의 점막에 정상적으로 서식하는 편리공생균이나 면역이 저하된 사람에게는 기회 감염을 유발 할 수 있다. *C. albicans* 는 점막과 심부조직 감염을 유발하는 진균 병원체로 알려져 있고 최근 병원 내 감염의 주 원인균 중 하나로 주목을 받고 있다.⁴

C. albicans 발병력 인자 (virulence factor)로는 숙주상피세포 부착능력,^{5,6} 가수 분해 효소들을 분비하는 능력,⁷ 효모형에서 균사형으로 전환하는 형태변환 능력⁸ 등이 알려져 있고 특히 바이오필름 형성능력이 높은 *C. albicans* 균주에서 마우스 치사 능이 높은 것이 보고되어 *C. albicans* 바이오필름 형성능이 중요한 발병력 인자임이 증명되었다.⁹

C. albicans 바이오필름 형성은 초기 (0 에서 11시간), 중기 (\approx 12시간에서 30시간), 성숙기 (\approx 38시간에서 72시간) 세 단계를 거친다.¹⁰ 처음 (0 에서 2시간까지)에는 대부분의 *C. albicans* 세포가 효모형이며 기질 기저층에 부착하는 시기이다. 이 초기 부착 단계는 세포표면의 소수성이나 전자결합과 같은 비특이적인 요인과 fibrinogen과 fibronectin과 같은 특정 수용체를 통한 특이적인 요인에 의해 조절된다.¹¹ 중기 단계는 부착된 *C. albicans* 가 계속 증식하여 효모형 세포가 균사체로 전환되며 기질을 형성한다. 성숙기 단계에는 기질 물질이 증가하여 삼차원적 구조를 이루며 완전히 성숙된 *C. albicans* 바이오필름은 다당류 기질내에 효모형, 가성균사, 균사체들이 치밀하게 연결된 있는 모습을 보인다.¹⁰

C. albicans 바이오필름의 단면적 구조를 살펴보면 기저층에는 효모형이 존재하여 이것이 세포 외 표면에 바이오필름을 고정시키는 역할을 하며 균사체는 구조적 뼈대를 이룬다.¹¹ 이렇게 형성된 바이오필름은 숙주의 면역 물질과 항진균제의 침투를 막는 보호 장벽으로 작용하며 바이오필름 아래에 위치하는 균의 물리적 파괴를 지연시킨다. *C. albicans* 의 두형태성은 바이오필름 형성에 영향을 미치는 주요한 요인으로 이것은 균사가 제거된 돌연변이 *C. albicans* 의 경우 기저층만 있는 바이오필름을 형성하였고 효모형이 제거된 돌연변이의 경우는 외층만 있는 바이오필름을 형성했다

고 보고되었다.¹²

인간에 편리공생하는 진균과 세균은 숙주의 물리적 장벽이 깨지거나 면역 방어가 잘 되지 않는 신체 부분에 감염을 유발한다. 이러한 감염에 취약한 신체 부분에는 보통 서로 다른 미생물들이 군집을 이루기 때문에 미생물이 지속적으로 존재하기 위해서는 숙주와의 관계뿐만 아니라 다른 미생물과의 경쟁에서도 건디어 내야 하는데, 미생물들이 서로 협력하는 관계가 되기 위해 성장에 필요한 복합 물질을 함께 분해시키거나 성장인자를 공유한다고 보고 되었다.¹³ 임상적으로 이러한 진균과 세균이 동시에 존재하는 복합 균주 감염은 신체 부분 외에도 체내 삽입 의료 기구에 형성된 바이오필름과도 연관이 되며, 균주의 다양성과 상호작용 때문에 숙주면역체계뿐 아니라 항생제치료에 잘 반응하지 않아 치료가 어려워 매우 중요하다. 최근 삽입 의료 기구가 점점 발전하여 그 사용이 빈번해지고 여기에 형성된 균의 바이오필름에 의한 질환 유도가 증가함에 따라 감염을 낮추기 위해 바이오필름 형성을 최소화 할 수 있는 재질의 연구가 많이 이루어지는 추세이다.¹⁴

이처럼 바이오필름 관련 연구가 활발해 졌으나 기존의 바이오필름 형성에 대한 연구는 세균과 세균 간에는 서로의 존재가 이롭게 작용한다는 보고가 중점을 이루었고¹⁵ 바이오필름 내에서 진균과 세균과의 상호작용에 대해서는 알려진 것이 적다. 진균이 형성한 세포 외 다량체 기질이 세균을 항생제로부터 보호하고, 또 세균성 기질은 진균을 항진균제로부터 보호한다는 보고도 있다.^{16,17} 하지만 진균 중 임상적으로 가장 중요한 *C. albicans* 가 실제 복합 균주 감염의 바이오필름 내에서 다른 세균과 어떤 상호작용을 하는지에 대해서는 알려진 바가 거의 없어 아직 명확하지 않다.

따라서 본 연구에서는 *C. albicans* 의 발병력 인자인 바이오필름 형성에 다른 세

균이 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 *C. albicans* 와 각각의 세균 단독 바이오필름 형성과 복합 균주 배양 시 바이오필름 형성능을 조사하였다. 또한 이 세균이 미치는 영향이 세균체의 물리적 영향 때문인지 어떤 다른 기전이 있는지 알아보기 위해 열처리로 죽인 세균 (사균)으로도 복합 균주 배양을 하였다. 실제 바이오필름 구조를 확인 하고자 주사전자현미경으로 관찰 하였고 이때 균사가 현저히 감소된 것이 관찰 되어 *C. albicans* 의 균사와 관련된 유전자 *SAP5*, *ALS3*, *ECE1*, *HWP1* 발현 분석을 위해 real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real-time RT-PCR)을 시행하였다.¹⁸⁻²⁰

병원 획득 감염으로는 요로 감염이 가장 흔하며, 주원인은 체내 삽입 의료 기구인 요카테터 때문으로 알려져 있어 본 연구 결과를 실제 임상에서 사용하는 요카테터에 적용해 보았다. *C. albicans* 와 복합 균주 배양할 세균도 주로 병원 내 요로 감염과 연관 있는 것으로 알려진 균 중에서 선택하였다.^{21,22}

II. 재료 및 방법

1. 실험 균주

연세대학교 원주의과대학 원주기독병원에 내원한 환자에서 분리 동정된 *Candida albicans* (*C. albicans*) 53 와 *C. albicans* 163, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Proteus vulgaris* (*P. vulgaris*), *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) 를 대상으로 본 연구를 수행하였다.

2. 균주 배양

C. albicans 는 Sabouraud's dextrose (SD) 한천 배지에 접종하여 30℃에서 18 시간 동안 배양하였다. *S. pyogenes* 와 *S. salivarius* 는 brain heart infusion (BHI) 한천 배지에 접종하여 37℃, 5% CO₂ 항온항습기에서 18시간 동안 배양하였다. *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* 와 *P. vulgaris* 는 trypticase soy 한천 배지에 접종하여 37℃에서 18시간 동안 배양하였다.

3. 바이오필름 생성

1) 96-well microtiter plate

C. albicans 는 50 mM glucose가 포함된 yeast nitrogen base (YNB, Difco TM, Becton Dickinson, Spark, MD, USA) 배지에 접종하여 30℃에서 140 rpm으로 18시

간 진탕 배양하였다. *S. pyogenes* 와 *S. salivarius* 는 BHI 배지에 접종하여 37℃, 5% CO₂ 항온항습기에서 18시간 동안 진탕 배양하였다. *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* 와 *P. vulgaris* 는 trypticase soy 액체 배지에 접종하여 37℃에서 18시간 동안 진탕 배양하였다. 균 배양액을 원심 분리하여 인산완충용액 (phosphate buffered saline, PBS)으로 세 번 세척하였다. *C. albicans* 균과 각각의 세균을 O.D. 값 0.1로 맞추어 100 mM glucose가 포함된 YNB 배지로 희석하여 96-well microtiter plate (Costar, Cambridge, MA, UAS)에 100 μ l 접종하여 37℃, 75 rpm으로 1시간 30분 배양한 후 plate에 약하게 붙은 균을 PBS 세척으로 제거하였다. 각 well에 각각의 균에 맞는 배지를 첨가하여 75 rpm으로 3일간 배양하였다. 미부착균을 PBS 세척으로 제거한 후 각 well마다 XTT (1 mg/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA), Menadione (0.4 mM, Sigma) 5:1 혼합액을 200 μ l씩 처리하여 빛이 차단된, 37℃에서 3시간 반응시키고 microplate reader (Emax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 요카테터

요카테터는 latex재질과 silicone elastomer-coated latex (SEC), 100% silicone 을 사용하였다. 먼저 각 재질의 요카테터를 직경 7 mm 타공기로 절단하였다. 자른 요카테터를 96-well microtiter plate에 안쪽 면이 위로 놓이게 삽입하여 ethylene oxide gas로 멸균하였다. 요카테터가 들어 있는 well에 serum을 24시간 동안 처리하였다. Serum을 제거하고 PBS로 3번 세척하였다. *C. albicans* 균과 각각의 세균을

O.D. 값 0.1로 맞추어 100 mM glucose가 포함된 YNB 배지로 희석하여 96-well microtiter plate (Costar, Cambridge, MA, UAS)에 100 μ l 접종하고 37°C, 75 rpm으로 1시간 30분 배양한 후 요카테터에 약하게 붙은 균을 PBS 세척으로 제거하였다. 각 well에 각각의 균에 맞는 배지를 첨가하여 75 rpm으로 5일간 배양하였다. 요카테터에 약하게 부착한 균을 PBS로 세척하여 제거하고 각 well 마다 XTT, Menadione 5:1 혼합액을 200 μ l씩 처리하여 빛이 차단된, 37°C에서 18시간 반응시켰다. Plate를 원심 분리하여 상등액 100 μ l만 새 96-well microplate로 옮긴 후 microplate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 주사전자현미경 (Scanning electron microscope)

주사전자현미경적 관찰을 위하여 바이오필름이 형성된 균들을 PBS로 두 번 세척하고 2.5% glutaraldehyde에 고정시켰다. 1% osmium tetroxide를 1시간 동안 처리하고 고정된 균들은 70% 에탄올에 10분, 95% 에탄올에 10분, 100% 에탄올에 20분간 처리하여 탈수하였다. 탈수된 균들은 금도금 과정을 거쳐 주사전자현미경 (TM-1000, Hitachi, Japan 15 kV) 하에서 관찰하였다.

5. 바이오필름 관련 유전자의 발현

C. albicans 균과 각각의 세균을 O.D. 값 0.1로 맞추어 100 mM glucose가 포함된 YNB 배지로 희석하여 24-well microplate에 100 μ l 접종하고 37°C, 75 rpm으로

1시간 30분 배양한 후 plate에 약하게 붙은 균을 PBS 세척으로 제거하였다. 각 well에 각각의 균에 맞는 배지를 첨가하여 75 rpm으로 24, 48시간 동안 배양하였다. 먼저 균 배양액을 원심 분리하여 배양액을 제거하고 PBS로 세 번 세척한 후 MasterPure™ yeast RNA purification kit (epicentre, Post Rd, Madison, WI, USA)로 RNA를 분리하였다. 균 덩어리를 10초간 vortex하여 느슨하게 만들어준 후 50 µg proteinase K가 포함된 extraction reagent 300 µl를 각 균에 처리하여 다시 10초간 vortex한 후 70℃에서 10분간 방치하였다. 5분간 ice에 방치한 후 MPC protein precipitation reagent를 175 µl 처리하고 10초간 vortex하였다. 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 새로운 tube로 옮겼다. Isopropanol 500 µl을 처리하고 30-40번 손으로 흔들어준 후 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 70% 에탄올을 1 ml 처리하여 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 제거하고 pellet을 공기 중에서 말렸다. RNase free Tris-EDTA (TE) 완충용액을 35 µl씩 넣어 잘 섞어 주었다. RNA 용액을 35 배 희석하여 UV spectrophotometer를 이용하여 260 nm 흡광도에서 정량 하였다. 1 µg의 RNA로부터 oligo dT primer와 reverse transcriptase를 사용하여 cDNA를 합성하였고, 합성된 cDNA를 주형으로 real time RT-PCR을 실시하였다. Real time RT-PCR 은 cDNA 0.3 µg, forward primer 2 pmol, reverse primer 2 pmol, SYBR Green PCR premix 5 µl를 혼합하여 총 10 µl 반응용액으로 만들어 ABI 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 50℃ 2분, 95℃ 10분 이후 95℃에서 15초, 60℃에서 45초의 반응을 40회 반복하였다. 유전자의 발현은 *PMA1*의 발현과 비교하여 정량화하였다. 중합효소연쇄반응 결과는 실시간 중합효소연쇄반응 기기에 의해 실시간으로 측정되어 cycle threshold

(Ct) 값으로 나타내었다.

Table 1. Primers used for real-time RT-PCR

Gene	Primer	Product size
HWP1	Forward 5'- TCAGCCTGATGACAATCCTC-3'	105 bp
	Reverse 5'- GCTGGAGTTGTTGGCTTTTC-3'	
PMA1	Forward 5'- ACTGCTGCCACAGTCAATGAAGC-3'	161 bp
	Reverse 5'- GCCATGTCACCACCACCGGA-3'	
SAP5	Forward 5'- CCAGCATCTTCCCGCACTT-3'	71 bp
	Reverse 5'-GCGTAAGAACCGTCACCATATTTAA-3'	
ALS3	Forward 5'-CAACTTGGGTTATTGAAACAAAAACA-3'	80 bp
	Reverse 5'-AGAAACAGAAACCCAAGAACAACCT-3'	
ECE1	Forward 5'-CCAGAAATTGTTGCTCGTGTTG-3'	138 bp
	Reverse 5'-CAGGACGCCATCAAAAACG-3'	

6. 통계학적 분석

통계적 유의성 검사는 t-test를 이용하였다. P value가 0.05 이하 일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

III. 결과

1. 세균의 바이오필름 형성

각각의 세균을 단독으로 배양했을 때 생성되는 바이오필름 형성 정도를 보기 위하여 96-well microtiter plate에 세균을 배양 후 XTT assay를 시행하였다. 배양 3일 후 측정한 O.D. 값은 *E. coli* 는 0.048, *P. aeruginosa* 는 0.081, *P. vulgaris* 는 0.072, *S. aureus* 는 0.155, *S. pyogenes* 는 0.239 그리고 *S. salivarius* 는 0.276으로 그람음성 세균보다 그람양성 세균이 바이오필름을 2 ~ 5배 더 많이 형성하였다 (Fig. 1).

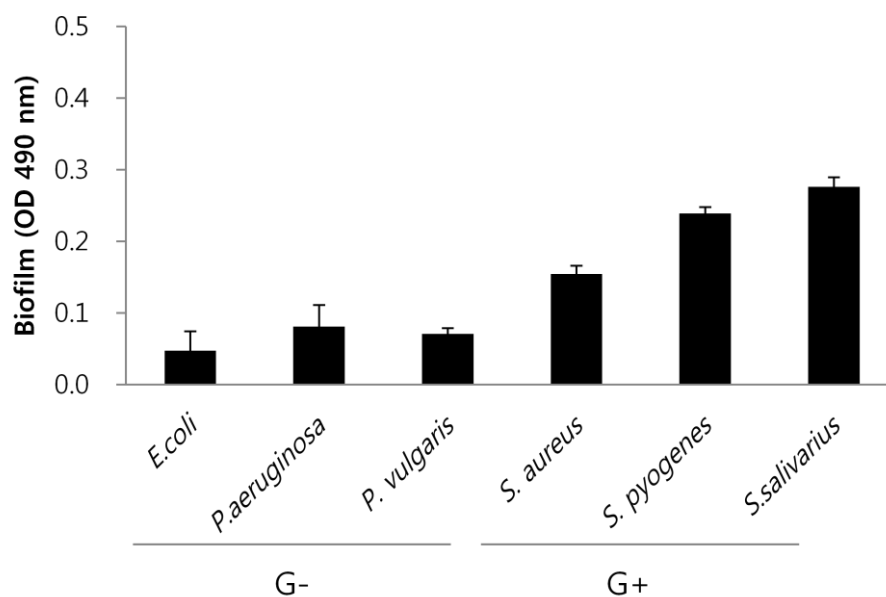


Figure 1. Biofilm formation on different bacteria. Suspensions of bacteria (OD. 0.2) alone were added at 96-well microtiter plate. After the initial adhesion phase, the loosely adherent cells removed. The cells were incubated at 37°C for 72 h. The amount of biofilm formed was measured using XTT assay. Absorbance at 490 nm was measured following incubation with XTT (1 mg /ml)–Menadion (0.4 mM) for 3 h. The data represent the average and standard deviation of three separate cultures.

G-; Gram negative

G+ ; Gram positive

2. 단독 균주 배양과 복합 균주 배양에서의 바이오필름 형성 비교

구강 정상세균총에서 분리한 균주인 *C. albicans* 53과 혈액에서 분리한 균주인 *C. albicans* 163에서 바이오필름 형성을 측정하였다. 3일 배양 후 XTT assay를 시행하여 측정한 O.D. 값은 *C. albicans* 53은 0.392, *C. albicans* 163은 2.406으로 *C. albicans* 163의 바이오필름 형성능력이 높았다. 복합 배양 시 변화를 보기 위해 두 *C. albicans* 균주를 함께 배양하였다. O.D. 값이 3.680으로 급격하게 증가하였다 (Table 2).

Table 2. Biofilm formation on different strains of *C. albicans*

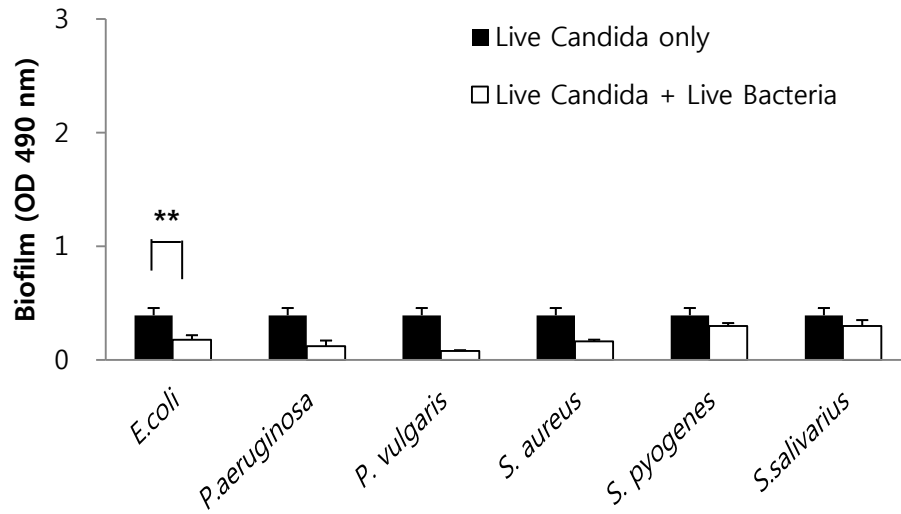
Organisms	XTT values (mean \pm SE)
<i>C. albicans</i> 53	0.392 \pm 0.064
<i>C. albicans</i> 163	2.406 \pm 0.064
<i>C. albicans</i> 53 + 163	3.680 \pm 0.058

* Values represent absorbance using XTT reduction assay

3. *C. albicans* 와 세균의 복합 균주 배양이 *C. albicans* 바이오필름 형성에 미치는 영향

C. albicans 를 단독 배양한 것과 6종의 각각 다른 세균을 *C. albicans* 와 함께 배양한 것의 바이오필름 형성을 비교하였다. *C. albicans* 53을 단독 배양한 것의 바이오필름 형성 정도를 보는 O.D. 값은 0.392인 반면, *E. coli* 와 함께 배양한 경우는 0.177, *P. aeruginosa* 의 경우는 0.120, *P. vulgaris* 는 0.079, *S. aureus* 는 0.162, *S. pyogenes* 는 0.298 그리고 *S. salivarius* 는 0.198이었다. 바이오필름 형성능력이 높은 *C. albicans* 163을 단독 배양 했을 때 바이오필름 형성 정도를 보는 O.D. 값은 2.406이었다. 각각 다른 6종의 세균과 함께 배양했을 때, *E. coli* 와 함께 배양한 경우는 0.182, *P. aeruginosa* 경우는 0.197, *P. vulgaris* 는 0.143, *S. aureus* 는 0.237, *S. pyogenes* 는 0.349 그리고 *S. salivarius* 는 0.157이었다 (Fig. 2). 바이오필름 형성능력이 낮은 *C. albicans* 와 높은 *C. albicans* 모두 다른 세균과 함께 배양한 것이 *C. albicans* 단독 배양한 것에 비해 바이오필름 형성이 저하되는 것을 확인하였다. 또 세균에 의한 바이오필름 형성 저해는 바이오필름 형성능력이 높은 *C. albicans* 163에서 바이오필름 형성능력이 낮은 *C. albicans* 53보다 뚜렷하게 나타났다.

C. albicans 53



C. albicans 163

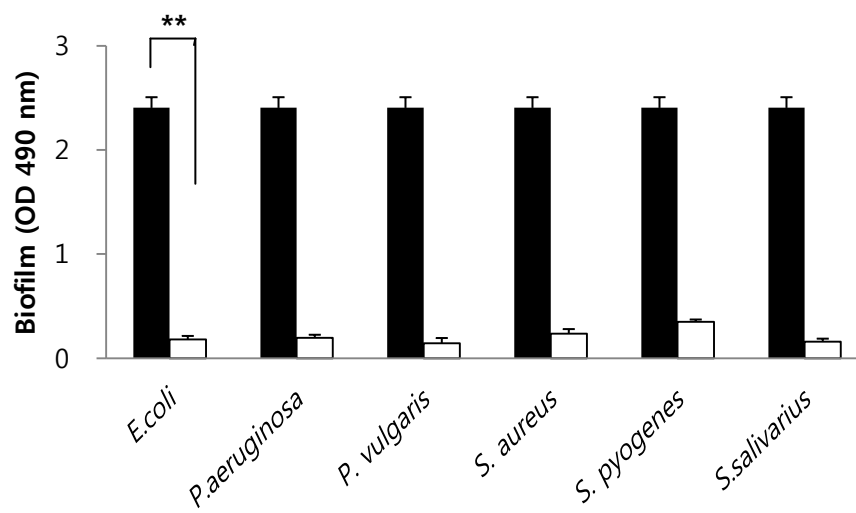


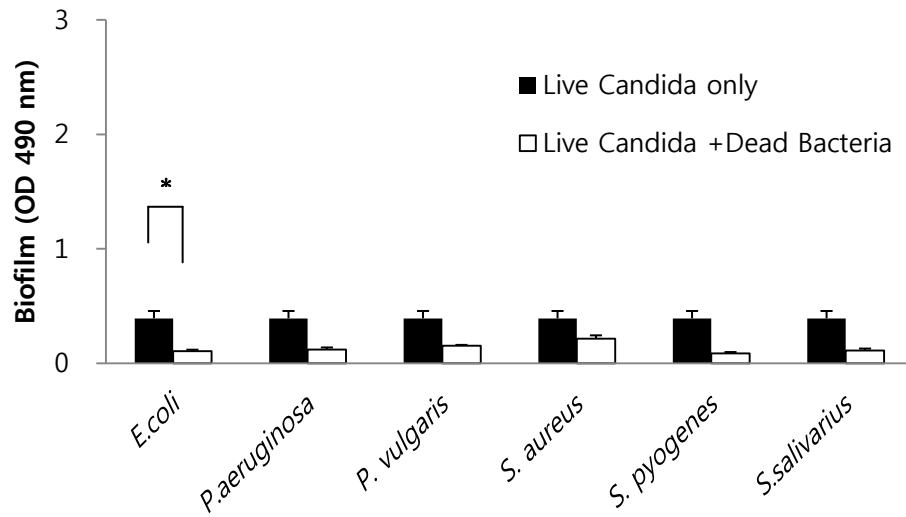
Figure 2. Effect of live bacteria presence on biofilm formation of *C. albicans*. Suspensions of bacteria (O.D. 0.1) and *C. albicans* (O.D. 0.1) were added at 96-well microtiter plate. The plate was incubated at 37°C for 72 h. The amount of biofilm formed was measured using XTT assay. Absorbance at 490 nm was measured following incubation with XTT (1 mg /ml)-Menadion (0.4 mM) for 3 h. The data represent the average and standard deviation of three separate cultures.

$**p<0.01$

4. *C. albicans* 와 사균의 복합 균주 배양이 바이오필름 형성에 미치는 영향

C. albicans 의 바이오필름 형성에 사균이 미치는 영향을 알아보기 위해 *C. albicans* 와 100℃에서 30분간 열처리로 죽인 각각의 균체를 넣어 함께 배양하였다. *C. albicans* 53을 단독 배양한 경우 O.D. 값은 0.392인 반면, 열처리로 죽인 *E. coli* 균체와 함께 배양한 경우 바이오필름 형성 정도를 보는 O.D. 값은 0.105, *P. aeruginosa* 와 함께 배양한 경우는 0.118, *P. vulgaris* 경우는 0.153, *S. aureus* 는 0.215, *S. pyogenes* 는 0.085 그리고 *S. salivarius* 는 0.111이었다. *C. albicans* 163을 단독 배양한 경우 O.D. 값은 2.409인 반면, 열처리로 죽인 *E. coli* 균체와 함께 배양한 경우 바이오필름 형성 정도를 보는 O.D. 값은 0.519, *P. aeruginosa* 와 함께 배양한 경우는 0.631, *P. vulgaris* 경우는 0.643, *S. aureus* 는 0.637, *S. pyogenes* 는 0.512 그리고 *S. salivarius* 는 0.534이었다 (Fig. 3). *C. albicans* 를 사균과 함께 배양하면 *C. albicans* 의 바이오필름 형성이 50 ~ 80% 감소되는 것으로 확인하였다.

C. albicans 53



C. albicans 163

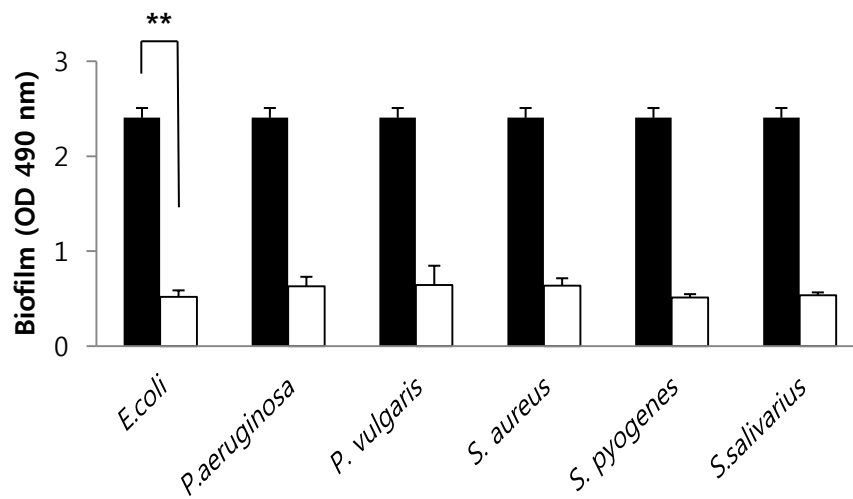


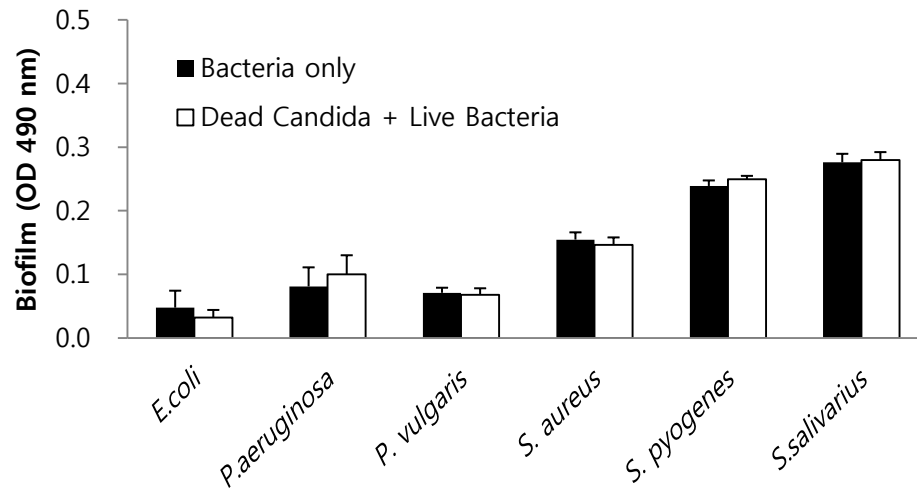
Figure 3. Effects of dead bacteria presence on biofilm formation of *C. albicans*. The bacteria were killed at 100°C for 30 min. Suspensions of bacteria (O.D. 0.1) and *C. albicans* (O.D. 0.1) were added at 96-well microtiter plate. The plate was incubated at 37°C for 72 h. The amount of biofilm formed was measured using XTT assay. Absorbance at 490 nm was measured following incubation with XTT (1 mg /ml)–Menadion (0.4 mM) for 3 h. The data represent the average and standard deviation of three separate cultures.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

5. 세균의 바이오필름 형성에 죽은 *C. albicans* 가 미치는 영향

세균을 단독으로 배양했을 때 바이오필름 형성과 100℃에서 30분간 열처리한 *C. albicans* 를 복합 균주 배양했을 때 바이오필름 형성을 관찰하였다. 열처리한 *C. albicans* 163 과 *E. coli* 와 함께 배양한 경우 바이오필름 형성 정도를 알아보는 O.D. 값은 0.033, *P. aeruginosa* 경우는 0.100, *P. vulgaris* 는 0.063, *S. aureus* 는 0.146, *S. pyogenes* 는 0.249 그리고 *S. salivarius* 는 0.189이었다 (Fig. 4). 열처리한 *C. albicans* 53을 세균과 함께 배양 한 경우에도 세균의 바이오필름 형성은 세균을 단독으로 배양한 경우와 유의한 차이가 없었다.

C. albicans 53



C. albicans 163

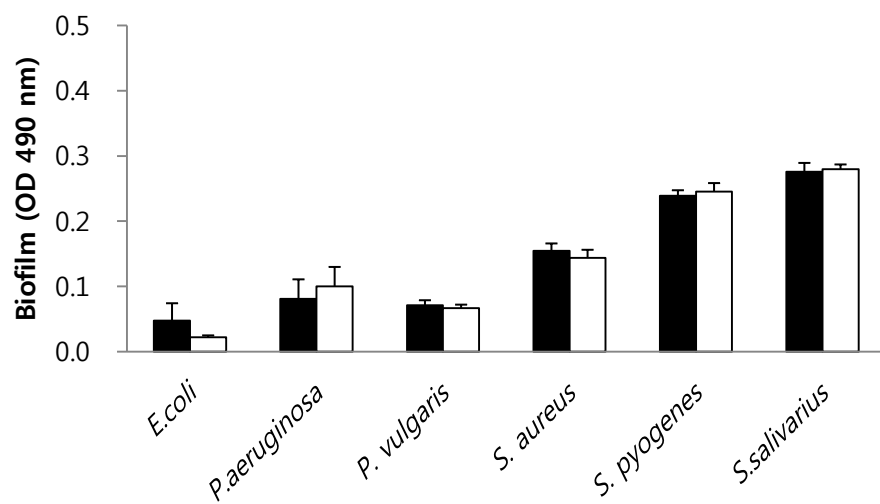
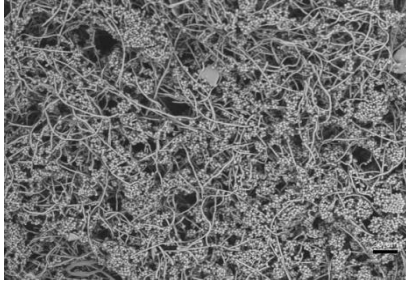


Figure 4. Effects of dead *C. albicans* presence on biofilm formation of live bacteria. The *C. albicans* were killed at 100°C for 30 min. Suspensions of bacteria (O.D. 0.1) and *C. albicans* (O.D. 0.1) were added at 96-well microtiter plate. The plate was incubated at 37°C for 72 h. The amount of biofilm formed was measured using XTT assay. Absorbance at 490 nm was measured following incubation with XTT (1 mg /ml)–Menadion (0.4 mM) for 3 h. The data represent the average and standard deviation of three separate cultures.

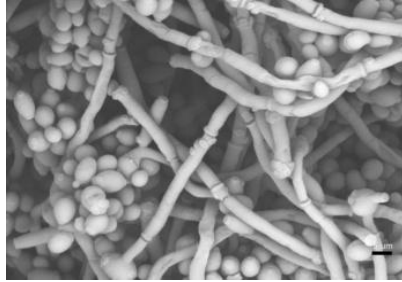
6. 단독 균주 배양과 복합 균주 배양에서 형성된 바이오필름의 구조

C. albicans 163을 단독 배양했을 때의 바이오필름과 *C. albicans* 163과 각각의 세균을 함께 배양한 후에 형성되는 바이오필름의 구조적 차이를 주사전자현미경으로 확인하였다. *C. albicans* 를 단독 배양했을 때 바이오필름은 밀집도가 높고 단단하며 여러 층의 *C. albicans* 가 관찰되었다. *C. albicans* 와 각각의 세균을 함께 배양한 후 형성된 바이오필름은 *C. albicans* 사이 사이에 세균이 끼어있는 형태를 보이고 바이오필름의 두께가 얇으며 밀집도도 낮다. *C. albicans* 163단독 배양한 것과 비교 시 현저히 균사체가 감소된 것이 관찰되었다 (Fig. 5). 열처리한 사균과 *C. albicans* 를 함께 배양한 후 형성된 바이오필름도 *C. albicans* 사이 사이에 세균이 끼어있는 형태를 보이고 바이오필름의 두께가 얇으며 밀집도도 낮아 바이오필름 형성이 감소되어 있는 것을 확인하였다 (Fig. 6).

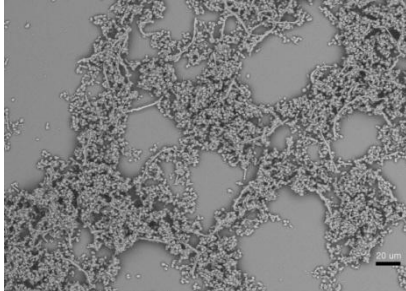
A Live *C. albicans*



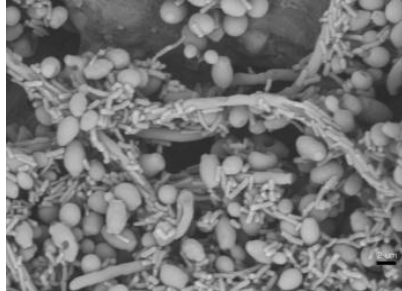
B



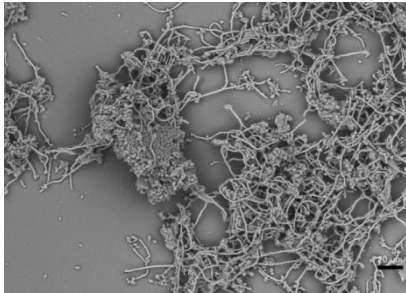
C Live *C. albicans* + Live *E. coli*



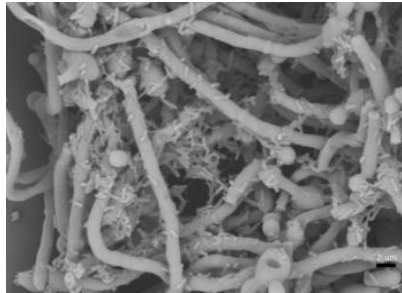
D



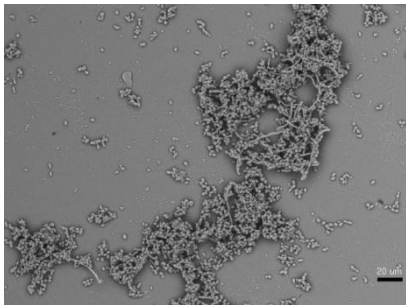
E Live *C. albicans* + Live *P. aeruginosa*



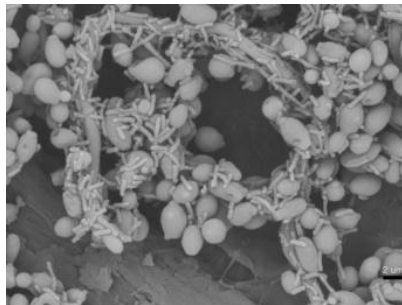
F



G Live *C. albicans* + Live *P. vulgaris*



H



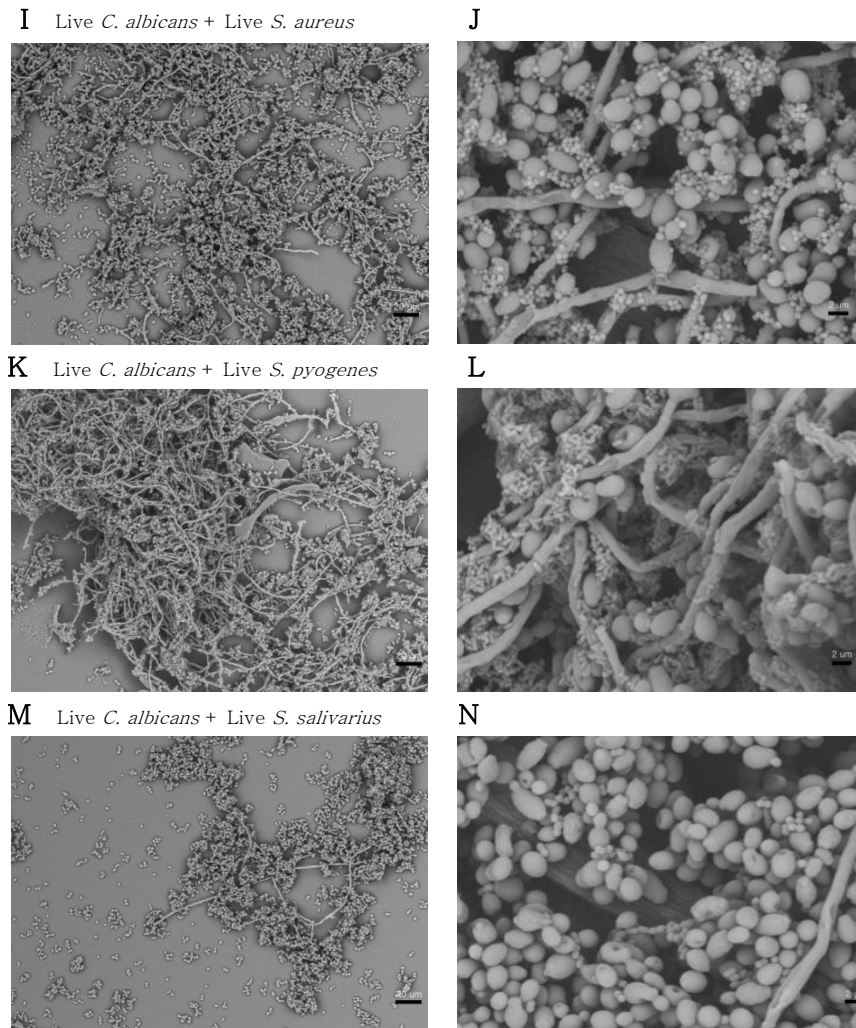
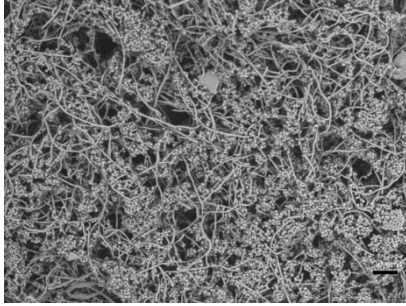


Figure 5. Scanning electron microscope images of biofilm formation. Live *C. albicans* (A and B), live *C. albicans* + live *E. coli* (C and D), live *C. albicans* + live *P. aeruginosa* (E and F), live *C. albicans* + live *P. vulgaris* (G and H), live *C. albicans* + live *S. aureus* (I and J), live *C. albicans* + live *S. pyogenes* (K and L), live *C. albicans* + live *S. salivarius* (M and N).

Magnification: $\times 500$ (A, C, E, G, I, K, M) or $\times 4000$ (B, D, F, H, J, L, N).

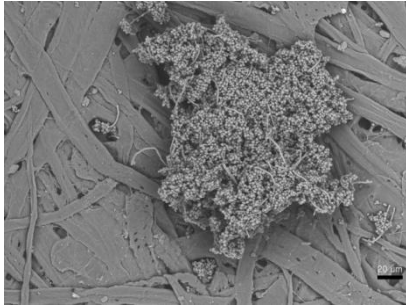
A Live *C. albicans*



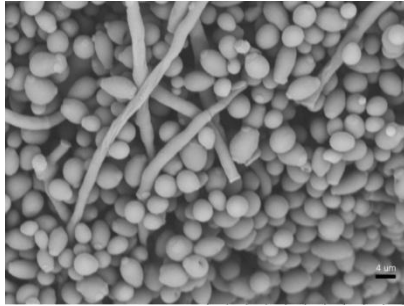
B



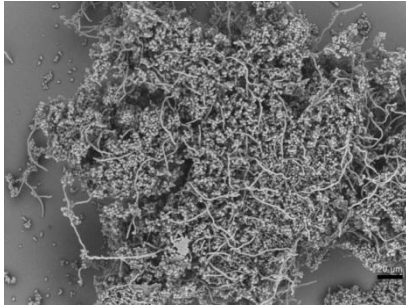
C Live *C. albicans* + Dead *E. coli*



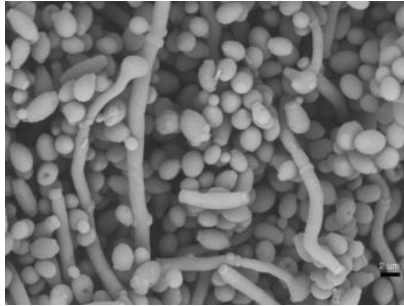
D



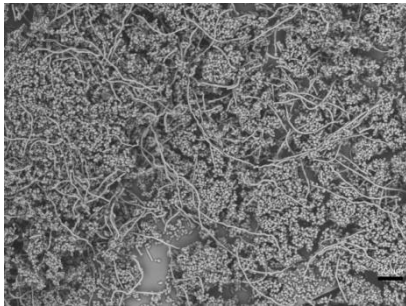
E Live *C. albicans* + Dead *P. aeruginosa*



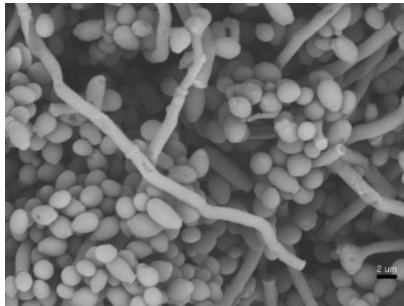
F



G Live *C. albicans* + Dead *P. vulgaris*



H



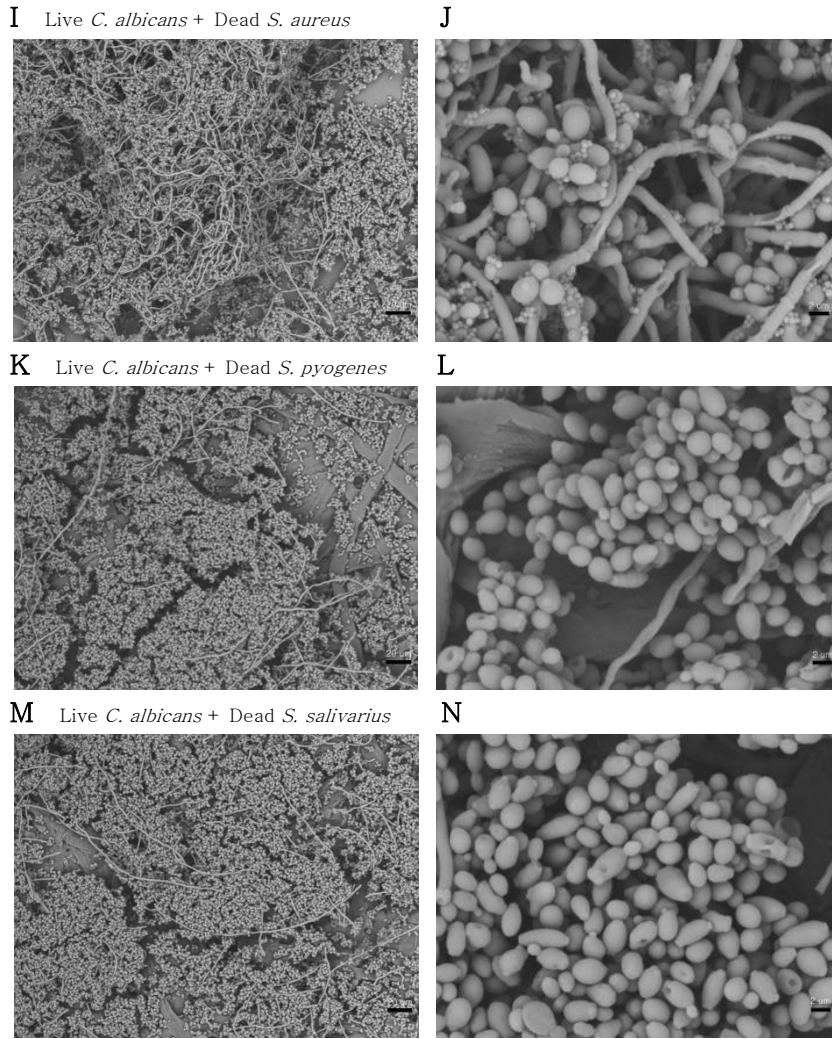


Figure 6. Scanning electron microscope images of biofilm formation. Live *C. albicans* (A and B), live *C. albicans* + dead *E. coli* (C and D), live *C. albicans* + dead *P. aeruginosa* (E and F), live *C. albicans* + dead *P. vulgaris* (G and H), live *C. albicans* + dead *S. aureus* (I and J), live *C. albicans* + dead *S. pyogenes* (K and L), live *C. albicans* + dead *S. salivarius* (M and N).

Magnification; $\times 500$ (A, C, E, G, I, K, M) or $\times 4000$ (B, D, F, H, J, L, N).

7. 유전자 발현 분석

1) *C. albicans* 바이오필름 형성 시 관련 유전자 발현

C. albicans 의 균사체 형성과 연관된 *SAP5*, *ALS3*, *ECE1*, *HWP1* 유전자의 발현이 바이오필름 형성 시 변화되는지 real-time RT-PCR로 살펴보았다. 각 유전자 발현은 *C. albicans* 의 house keeping gene인 *PMA1* 의 발현과 비교하여 정량화하였다. 우선 효모형 일 때의 유전자 발현을 측정하였다. 이후 바이오필름을 유도하기 위해 배지를 첨가한 다음 시간대 별로 (24시간, 48시간) 유전자 발현을 측정하여 효모형 상태의 발현양과 비교하였다. 효모형 일 때보다 바이오필름을 형성하는 시간이 지날수록 *SAP5*, *ALS3*, *ECE1*, *HWP1* 유전자 발현이 모두 증가하는 것을 관찰 하였다. *SAP5* 는 24시간 뒤 1.3배, 48시간 뒤 1.6배 증가하였고, *ALS3* 는 24시간 뒤 1.5배, 48시간 뒤 1.6배였다. *ECE1* 은 24시간 뒤 1.7배, 48시간 뒤 2.3배였으며, *HWP1* 은 24시간 뒤 2.6배, 48시간 뒤 3.2배 증가하였다 (Fig. 7).

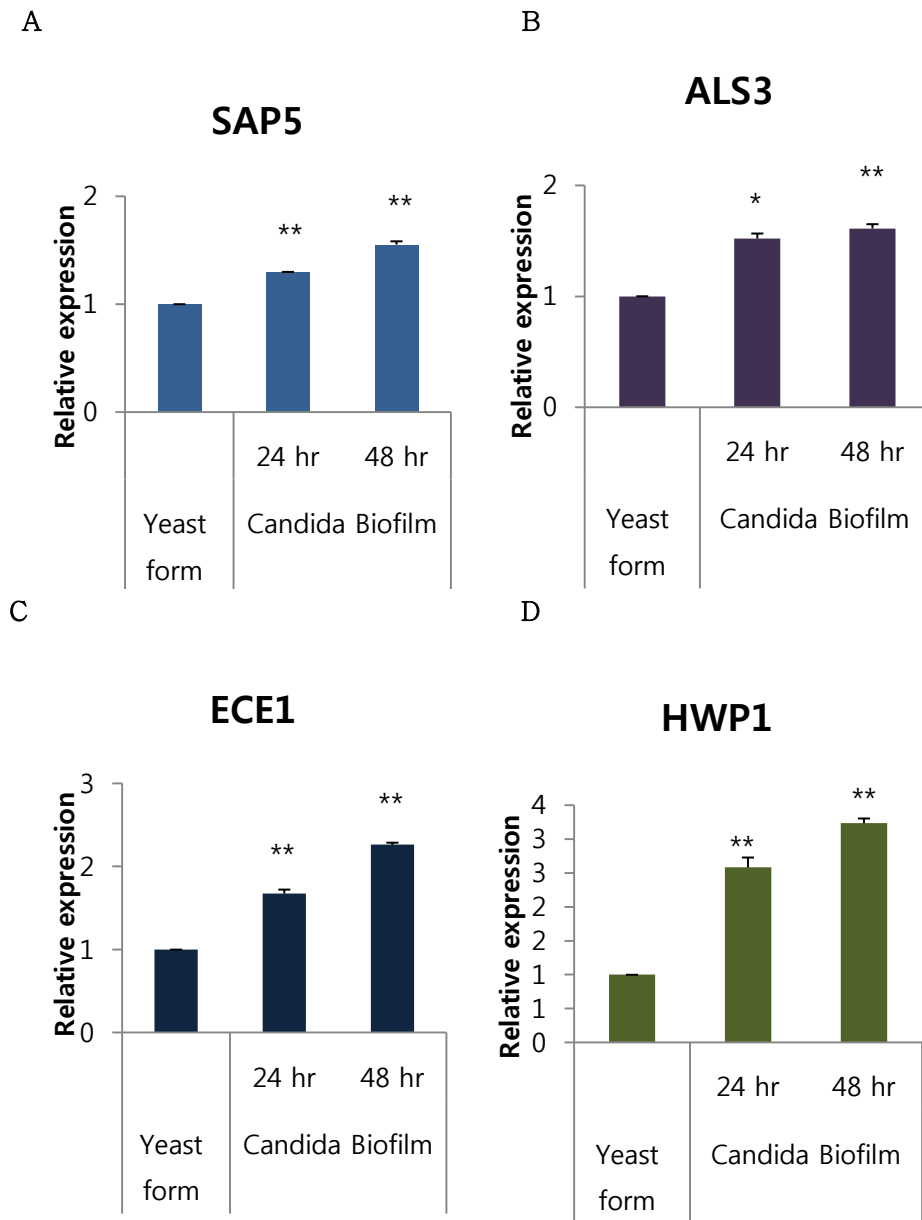
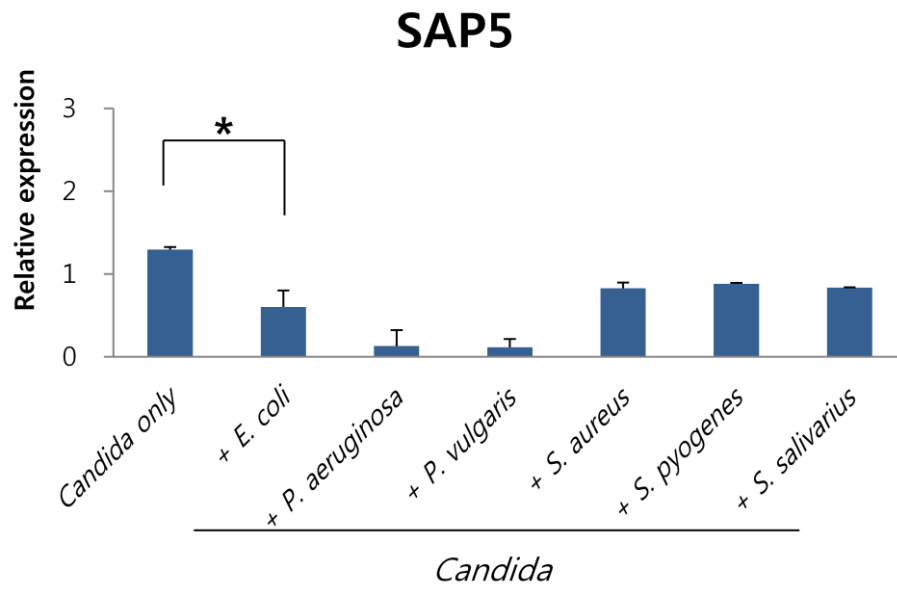


Figure 7. Relative quantitation of *SAP5* (A), *ALS3* (B), *ECE1* (C), and *HWP1* (D) gene expressions. The expressions of mRNA were evaluated via quantitative real-time RT-PCR (normalized to house-keeping gene, *PMA1*) in *C. albicans* biofilm formation. The data represent the average and standard deviation of three separate cultures. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

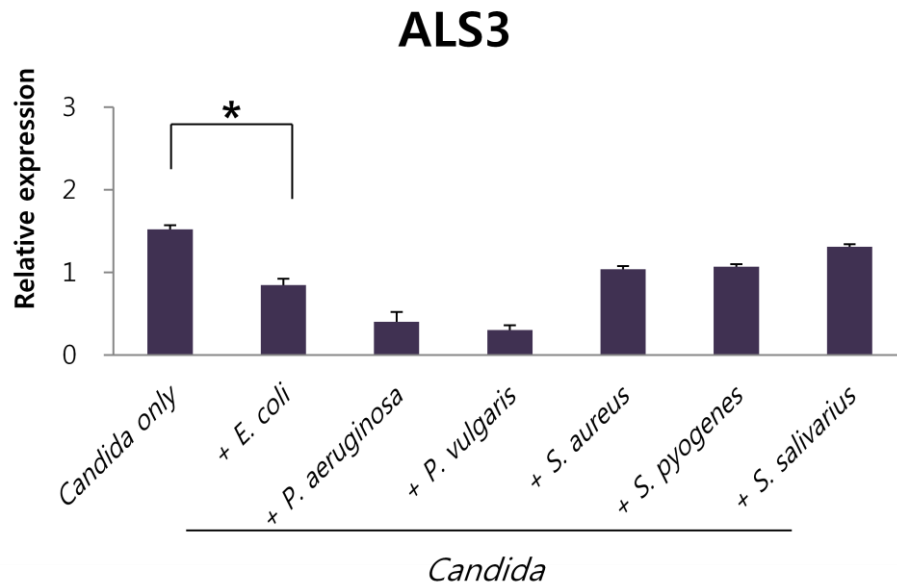
2) *C. albicans* 와 세균의 복합 균주 배양 시 유전자 발현

C. albicans 단독 배양시 효모형 일 때보다 바이오필름을 형성하는 시간이 지날 수록 *SAP5*, *ALS3*, *ECE1*, *HWP1* 유전자 발현이 모두 증가하는 것을 관찰 하였다. *C. albicans* 와 다른 세균을 함께 24시간 배양한 후 유전자 발현을 측정하여 *C. albicans* 단독 배양했을 때와 비교 시 *SAP5*, *ALS3*, *ECE1*, *HWP1* 모두 유의하게 감소했다. *SAP5* 는 *C. albicans* 단독 배양 시 1.3이었으나 *E. coli* 와 복합 배양 시 0.6, *P. aeruginosa* 와 복합 배양 시 0.1, *P. vulgaris* 와 복합 배양 시 0.1, *S. aureus* 와 복합 배양 시 0.8, *S. pyogenes* 와 복합 배양 시 0.9, *S. salivarius* 와 복합 배양 시 0.8로 감소했다. *ALS3* 는 *C. albicans* 단독 배양시 1.5, *E. coli* 와 복합 배양 시 0.8, *P. aeruginosa* 와 복합 배양 시 0.4, *P. vulgaris* 와 복합 배양 시 0.3, *S. aureus* 와 복합 배양 시 1.0, *S. pyogenes* 와 복합 배양 시 1.1, *S. salivarius* 와 복합 배양 시 1.3로 감소했다. *ECE1* 은 *C. albicans* 단독 배양시 1.7, *E. coli* 와 복합 배양 시 0.8, *P. aeruginosa* 와 복합 배양 시 0.9, *P. vulgaris* 와 복합 배양 시 0.2, *S. aureus* 와 복합 배양 시 0.9, *S. pyogenes* 와 복합 배양 시 0.8, *S. salivarius* 와 복합 배양 시 0.9로 감소했다. *HWP1* 은 *C. albicans* 단독 배양시 1.9, *E. coli* 와 복합 배양 시 0.7, *P. aeruginosa* 와 복합 배양 시 0.3, *P. vulgaris* 와 복합 배양 시 0.4, *S. aureus* 와 복합 배양 시 0.8, *S. pyogenes* 와 복합 배양 시 0.8, *S. salivarius* 와 복합 배양 시 0.8로 감소했다. 그람음성 세균이 그람양성 세균보다 1.5 ~ 10배 더 유전자 발현 억제 소견을 보였다 (Fig. 8).

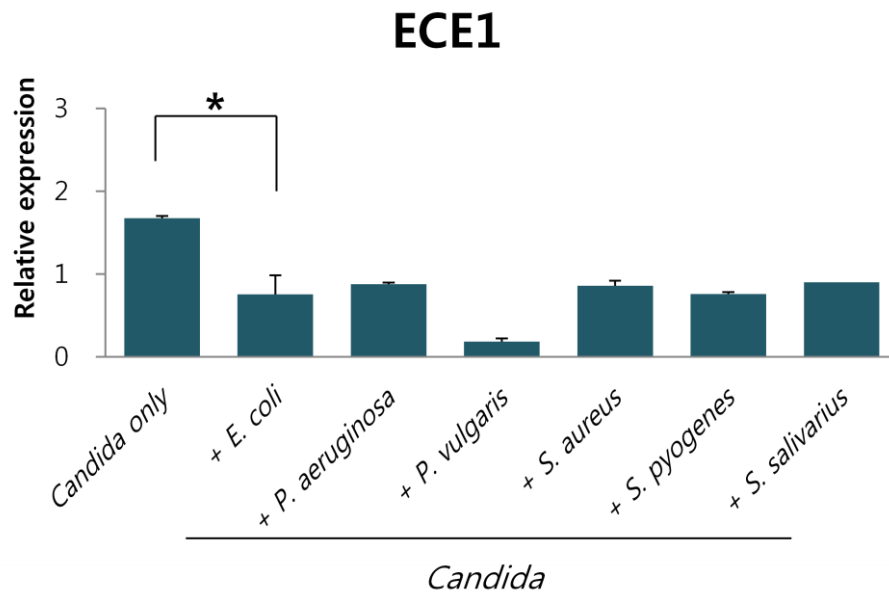
A



B



C



D

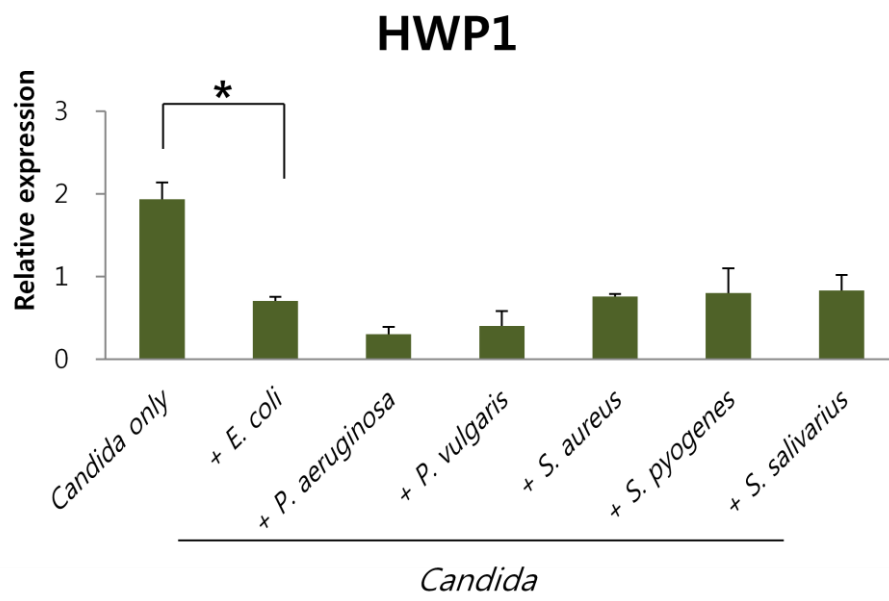


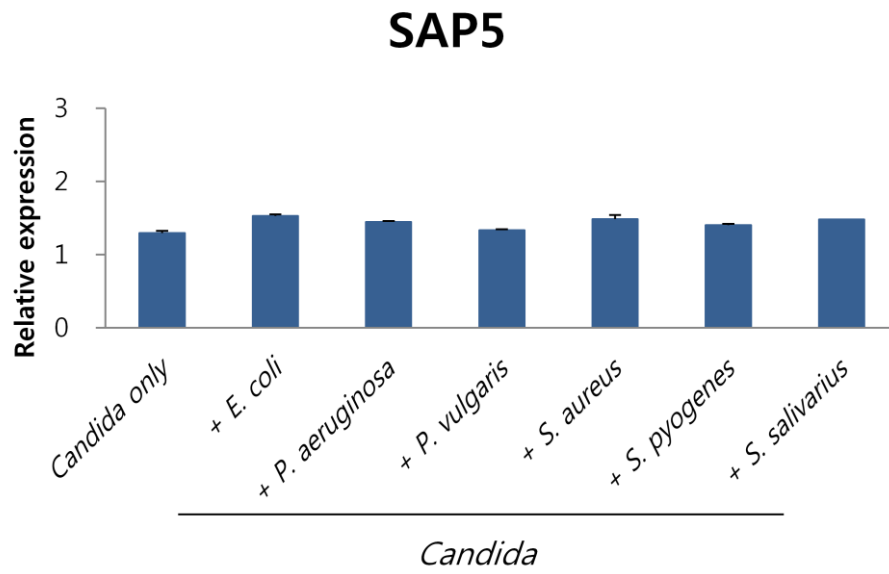
Figure 8. Effect of live bacteria presence on expression of hyphae related gene on *C. albicans*. Relative quantitation of *SAP5* (A), *ALS3* (B), *ECE1* (C), and *HWP1* (D) gene expressions. The gene expressions of mRNA were evaluated via quantitative real-time RT-PCR (normalized to house-keeping gene, *PMAl*) in *C. albicans* at 24 h of mixed-species culture with several live bacteria. The data represent the average and standard deviation of three separate cultures.

* $p < 0.05$

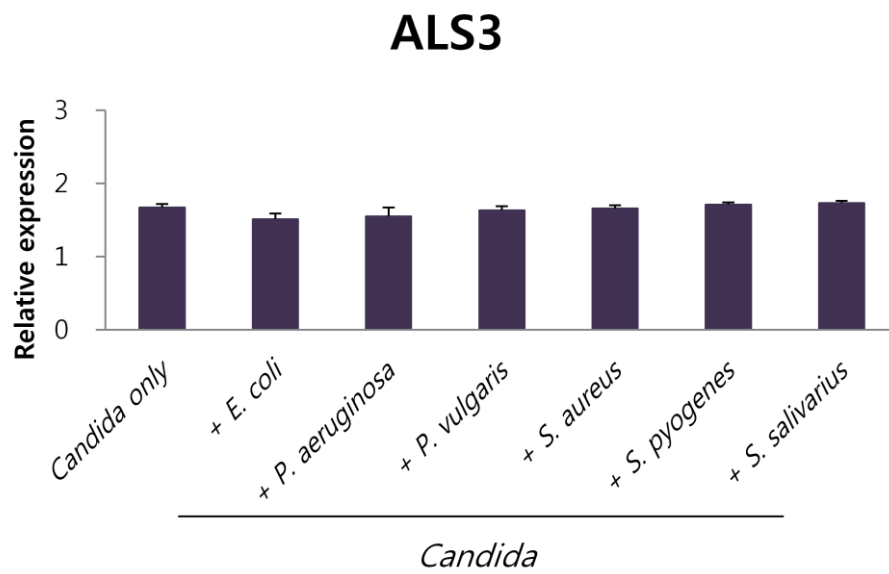
3) *C. albicans* 와 사균의 복합 균주 배양 시 유전자 발현

C. albicans 와 열처리된 죽인 사균을 함께 24시간 배양한 후 측정된 유전자 발현을 *C. albicans* 단독 배양했을 때와 비교하였다. *SAP5* 의 발현은 *C. albicans* 단독으로 배양한 경우 1.3이었고 사균과 복합 배양한 경우는 1.3에서 1.5사이로 감소하지 않았다. *ALS3* 의 발현은 *C. albicans* 단독으로 배양한 경우 1.5으로 사균과 복합 배양하여도 발현량의 차이는 나타나지 않았다. *ECE1*, *HWP1* 유전자 모두 *C. albicans* 단독 배양한 경우와 사균과 복합 배양한 경우 비교시 유의한 발현량의 차이를 보이지 않았다 (Fig. 9).

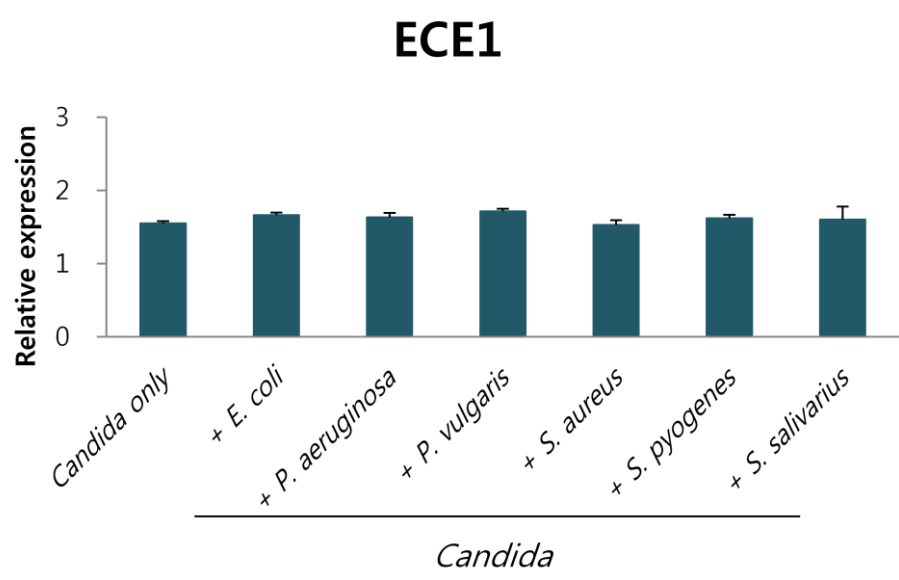
A



B



C



D

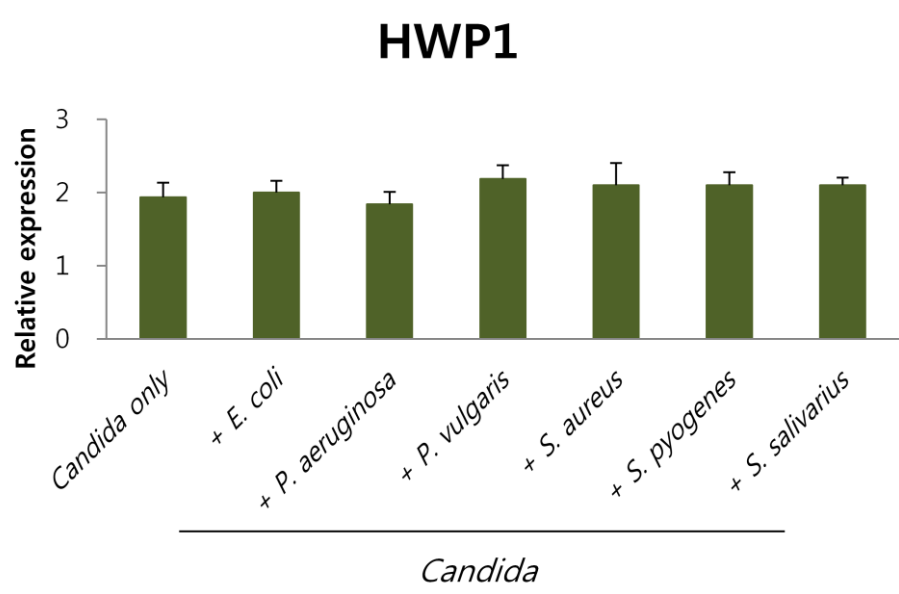


Figure 9. Effect of dead bacteria presence on expression of hyphae related gene on *C. albicans*. Relative quantitation of *SAP5* (A), *ALS3* (B), *ECE1* (C), and *HWP1* (D) gene expressions. The gene expressions of mRNA were evaluated via quantitative real time RT-PCR (normalized to house-keeping gene, *PMAl*) in *C. albicans* at 24 h of mixed-species culture with several dead bacteria. The data represent the average and standard deviation of three separate cultures.

8. 요카테터 적용

1) 요카테터의 주사전자현미경 관찰 상

요카테터는 실제 임상에서 쓰이고 있는 latex, SEC, 100% silicone 3가지 재질을 선택하였다. 균 배양 실험을 하기 전 재질 표면을 주사전자현미경으로 관찰 하였다. Latex는 표면에 물결모양의 주름이 있었고 SEC는 군데군데 흠처럼 파인 곳이 많았고 100% silicone은 표면이 아주 매끈했다 (Fig. 10).

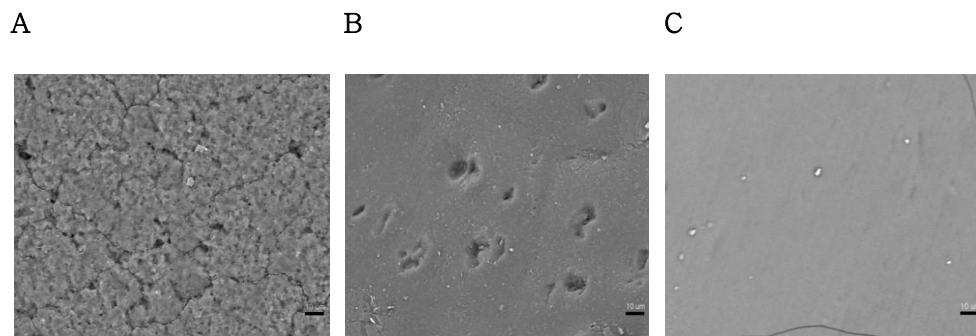
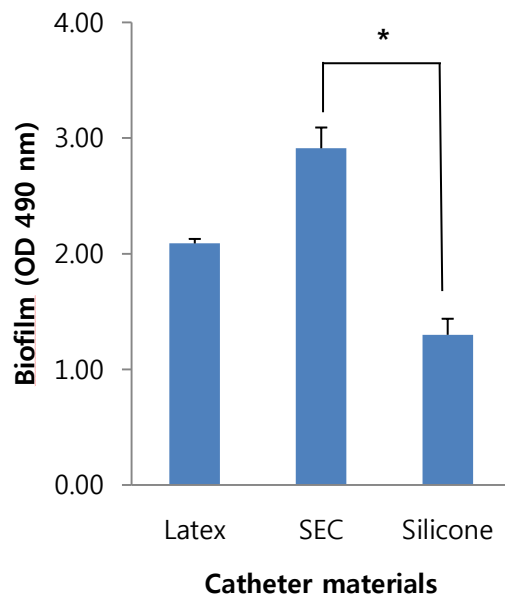


Figure 10. Scanning electron microscopoe images on indicated catheter materials inside. Latex (A), SEC (B), 100% silicone (C). Magnification; $\times 1000$.

2) 요카테터에서 *C. albicans* 단독 배양 시 바이오필름 형성

C. albicans 단독 배양한 후 요카테터 재질 별로 바이오필름 형성 정도를 보는 O.D. 값을 측정하였다. O.D. 값은 SEC에서 2.913로 가장 높았고 latex는 2.09, 100% silicone은 1.3으로 가장 낮았다. 각 재질 별로 형성된 바이오필름을 주사전자현미경으로 관찰 하였다. *C. albicans* 를 단독 배양했을 때 latex에서는 두께가 얇기는 하지만 재질 전반에 걸쳐 형성된 바이오필름이 관찰되었고 SEC에서는 표면의 홈에 균들이 촘촘하게 박혀있는 양상으로 두꺼운 바이오필름이 확인되었다. 100% silicone은 매끄러운 표면에 국소적으로 층이 얇은 바이오필름이 관찰되었다 (Fig. 11).

A



B

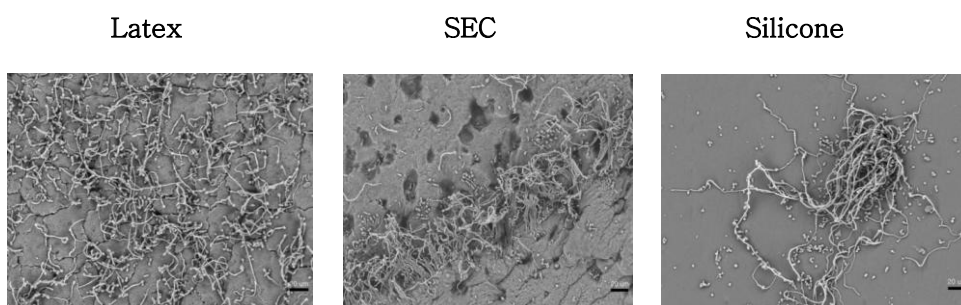


Figure 11. Biofilm formation of *C. albicans* at different catheter materials. The amount of biofilm (A) and its scanning electron microscope images (B). Live *C. albicans* (O.D. 0.2) was added at three different catheters (latex, SEC, silicone) in the 96-well microtiter plate. The plate was incubated for 1.5 h at 37°C in orbital shaker at 75 rpm. After the initial adhesion phase, the cells suspensions were aspirated and each well was washed twice with PBS to remove loosely adherent cells. Then 200 $\mu\ell$ of fresh TSB or BHI was added to each well for promotion of biofilm growth and incubated at 37 °C for 120 h in orbital shaker at 75 rpm. The amount of biofilm formation was measured using XTT assay. Absorbance at 490 nm was measured following incubation with XTT (1 mg /ml)–Menadion (0.4 mM) for 18 h. The data represent the average and standard deviation of three separate cultures. * p<0.05, Magnification; \times 500.

3) 요카테터에서 *C. albicans* 와 세균과의 복합 균주 배양 시 바이오필름 형성

C. albicans 단독 배양한 후 요카테터 재질 별로 바이오필름 형성을 측정했을 때 O.D. 값이 SEC에서 2.913로 가장 높았고 latex는 2.09, 100% silicone은 1.3으로 가장 낮았다. *C. albicans* 와 세균을 요카테터 재질 별로 복합 배양하여 바이오필름 형성을 측정하였다 (Fig. 11). *C. albicans* 와 *E. coli* 를 함께 배양한 경우 각 재질의 바이오필름 형성 정도를 보는 O.D. 값은 latex에서 0.306, SEC에서는 0.435, silicone은 0.353로 SEC에서 바이오필름이 가장 많이 형성되었지만, *C. albicans* 를 단독으로 배양한 것에 비해 30 ~ 90% 감소하였다. 열처리로 죽인 *E. coli* 균체를 넣어 함께 배양한 경우 O.D. 값은 latex에서 1.308, SEC는 1.883, silicone은 1.059로 바이오필름 형성이 *C. albicans* 단독으로 배양한 것 (latex 2.09, SEC 2.913, silicone 1.3)에 비해 40 ~ 50% 감소하였지만, *E. coli* 생균과 함께 배양한 O.D. 값 (latex 0.306, SEC 0.435, silicone 0.353)보다는 감소 폭이 적었다 (Fig. 12).

P. aeruginosa 는 세균 단독으로도 요카테터에 바이오필름 형성을 측정했을 때 O.D. 값이 높았고 (latex는 1.046, SEC는 1.328, silicone은 1.073), *C. albicans* 와 함께 배양했을 경우 O.D. 값은 latex에서는 0.961, SEC는 1.336, silicone은 1.17로 *C. albicans* 단독 배양 값 (latex 2.09, SEC 2.913, silicone 1.3)보다 10 ~ 50% 감소하였다. 열처리로 죽인 *P. aeruginosa* 균체를 넣어 함께 배양한 경우, latex는 1.214, SEC는 2.016, silicone은 1.051로 O.D. 값이 *C. albicans* 를 단독으로 배양한 것 (latex 2.09, SEC 2.913, silicone 1.3)에 비해 20 ~ 40% 감소하였지만 *P. aeruginosa* 생균과 함께 배양한 값 (latex 0.961, SEC 1.336, silicone 1.17)보다는 감소 폭이 적

었다 (Fig. 13).

C. albicans 와 *P. vulgaris* 를 함께 배양한 경우 O.D. 값은 latex 0.355, SEC 0.227, silicone 0.423으로 *C. albicans* 를 단독으로 배양한 경우 (latex 2.09, SEC 2.913, silicone 1.3)보다 70 ~ 90% 감소하였고 열처리로 죽인 *P. vulgaris* 균체를 넣어 함께 배양한 경우, latex 1.492, SEC 1.915, silicone 1.22로 *C. albicans* 를 단독으로 배양한 것 (latex 2.09, SEC 2.913, silicone 1.3)에 비해 10 ~ 30% 감소하였지만 *P. vulgaris* 생균과 함께 배양한 값 (latex 0.355, SEC 0.227, silicone 0.423)보다는 감소 폭이 적었다 (Fig. 14).

C. albicans 와 *S. aureus* 를 함께 배양한 경우 바이오필름 형성을 측정했을 때 O.D. 값은 latex 0.358, SEC 0.298, silicone 0.586으로 *C. albicans* 를 단독으로 배양한 경우 (latex 2.09, SEC 2.913, silicone 1.3)보다 50 ~ 90% 감소하였고 열처리로 죽인 *S. aureus* 균체를 넣어 함께 배양한 경우, latex 0.79, SEC 1.598, silicone 0.789로 *C. albicans* 를 단독으로 배양한 것 (latex 2.09, SEC 2.913, silicone 1.3)에 비해 40 ~ 50% 감소하였지만 *S. aureus* 생균과 함께 배양한 값 (latex 0.358, SEC 0.298, silicone 0.586)보다는 감소 폭이 적었다 (Fig. 15).

C. albicans 와 *S. pyogenes* 복합 균주 배양 시 바이오필름 형성을 측정했을 때 O.D. 값은 latex 0.433, SEC 0.457, silicone 0.377이고, 열처리로 죽인 *S. pyogenes* 균체를 넣어 함께 배양했을 때는 latex 0.873, SEC 1.126, silicone 0.583으로 *C. albicans* 를 단독으로 배양한 것 (latex 2.09, SEC 2.913, silicone 1.3)에 비해 열처리로 죽인 *S. pyogenes* 는 50 ~ 60%, *S. pyogenes* 생균 복합 배양은 70 ~ 90% 순으로 감소하였다 (Fig. 16).

C. albicans 와 *S. salivarius* 복합 균주 배양 시 바이오필름 형성을 측정했을 때 O.D. 값은 latex 0.466, SEC 0.73, silicone 0.381이고, 열처리로 죽인 *S. salivarius* 균체를 *C. albicans* 와 함께 배양했을 때는 latex 0.579, SEC 0.925, silicone 0.533으로 *C. albicans* 를 단독으로 배양한 것 (latex 2.09, SEC 2.913, silicone 1.3)에 비해 열처리로 죽인 *S. salivarius* 는 60 ~ 70%, *S. salivarius* 생균 복합 배양은 70 ~ 80% 순으로 감소하였다 (Fig. 17).

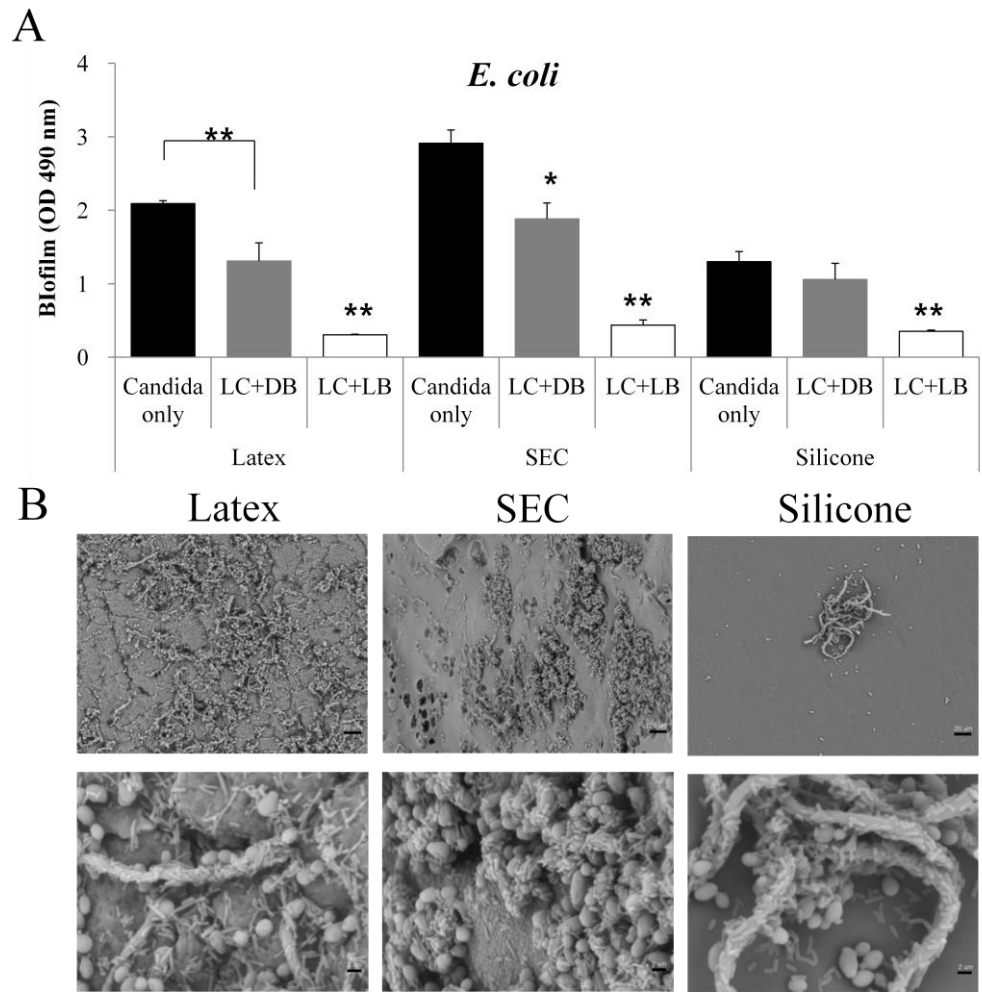


Figure 12. Effect of live and dead *E. coli* presence on biofilm formation of *C. albicans* at different catheter materials. XTT reduction assay (A), SEM images (B). Mixed-species culture of *C. albicans* with live bacteria or dead bacteria were performed on three different catheters (latex, SEC, silicone). The data represent the average and standard deviation of three separate cultures. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Magnification; $\times 500$, $\times 4000$.

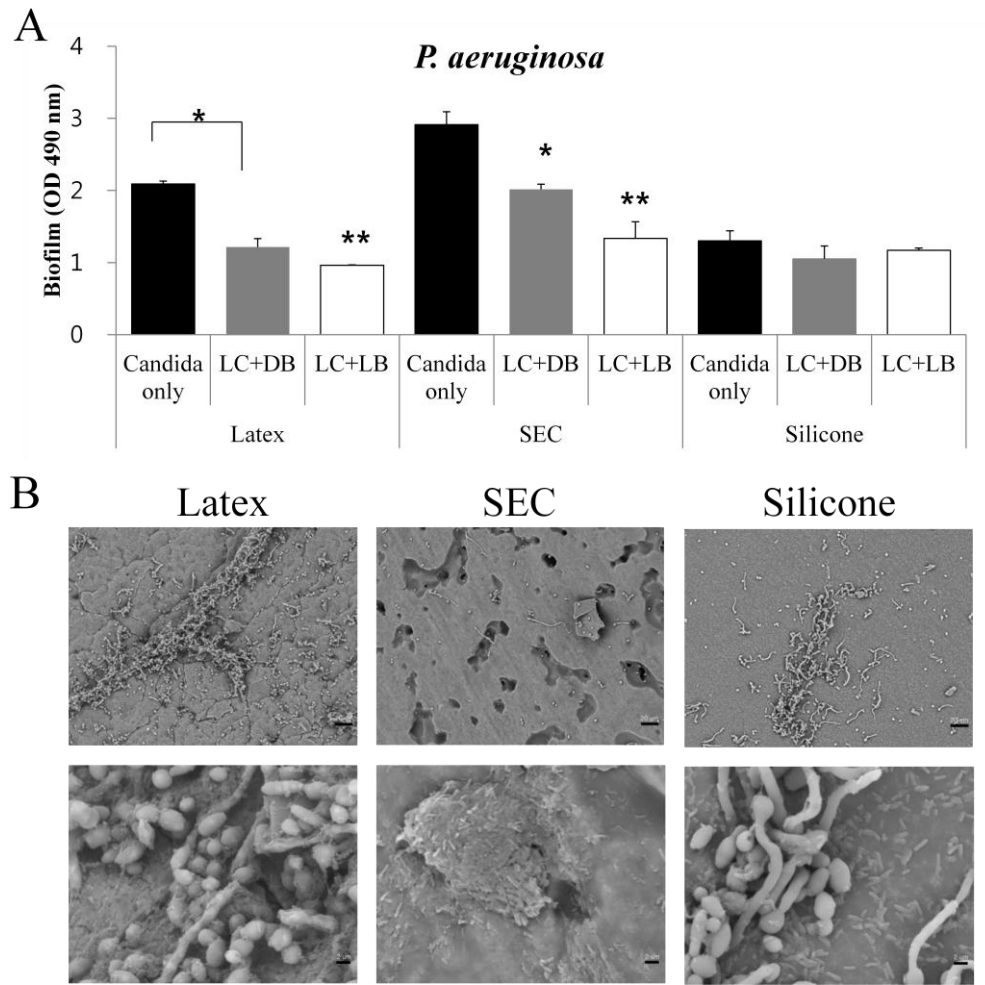


Figure 13. Effect of live and dead *P. aeruginosa* presence on biofilm formation of *C. albicans* at different catheter materials. XTT reduction assay (A), SEM images (B). Mixed-species culture of *C. albicans* with live bacteria or dead bacteria were performed on three different catheters (latex, SEC, silicone). The data represent the average and standard deviation of three separate cultures. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Magnification; $\times 500$, $\times 4000$.

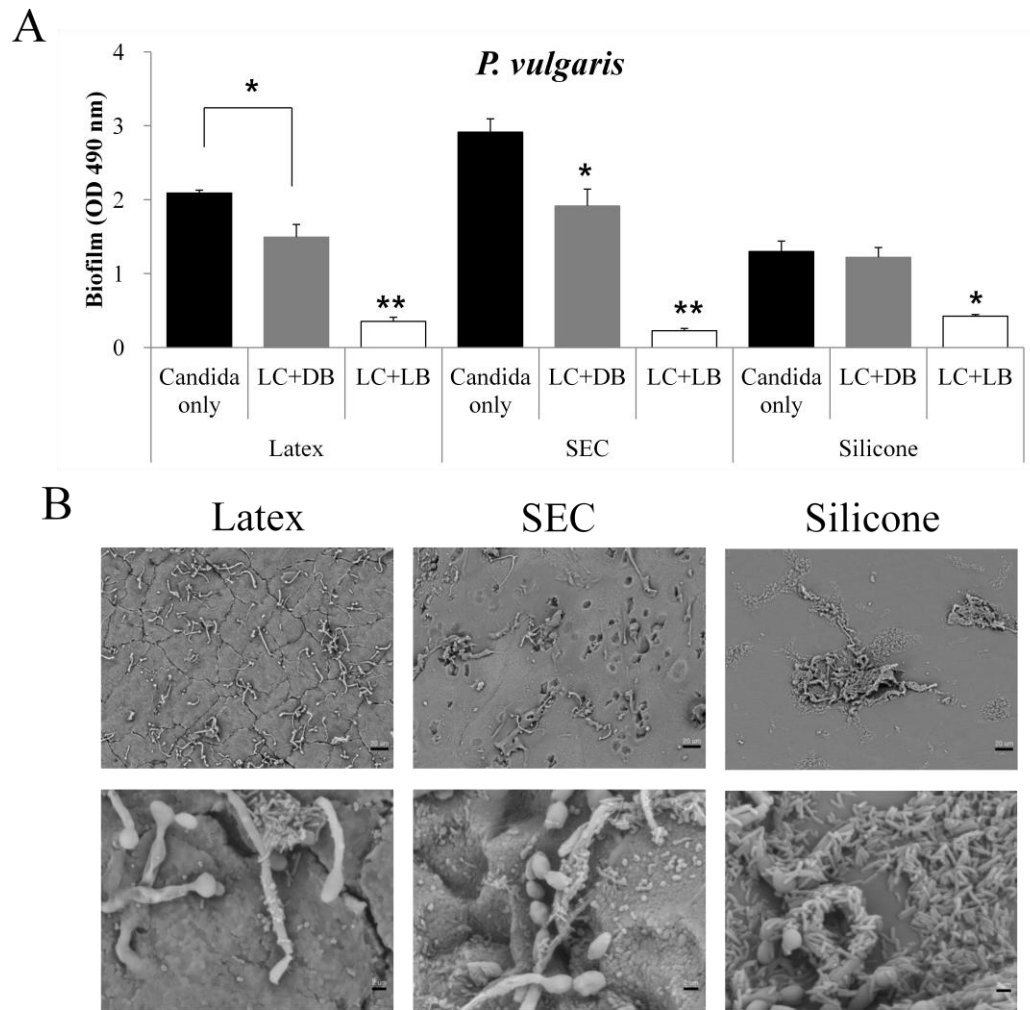


Figure 14. Effect of live and dead *P. vulgaris* presence on biofilm formation of *C. albicans* at different catheter materials. XTT reduction assay (A), SEM images (B). Mixed-species culture of *C. albicans* with live bacteria or dead bacteria were performed on three different catheters (latex, SEC, silicone). The data represent the average and standard deviation of three separate cultures. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Magnification; $\times 500$, $\times 4000$.

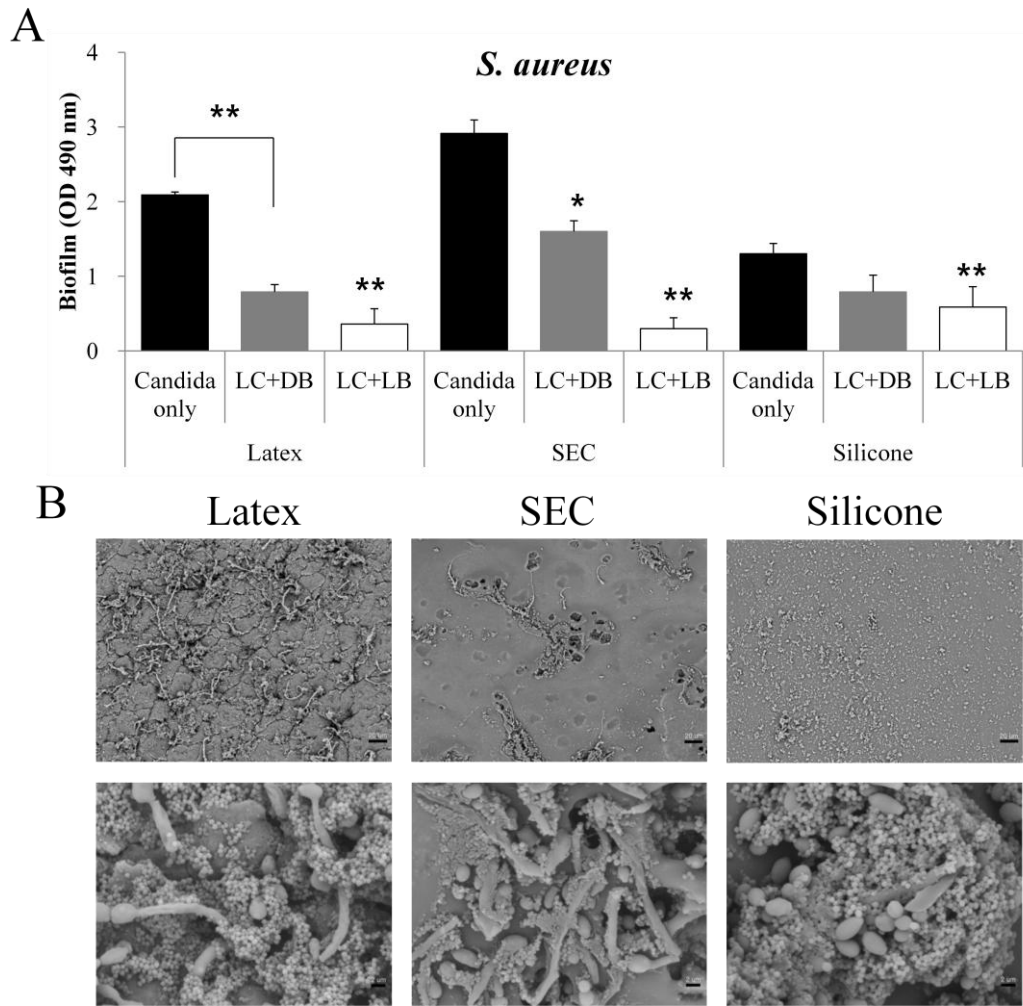


Figure 15. Effect of live and dead *S. aureus* presence on biofilm formation of *C. albicans* at different catheter materials. XTT reduction assay (A), SEM images (B). Mixed-species culture of *C. albicans* with live bacteria or dead bacteria were performed on three different catheters (latex, SEC, silicone). The data represent the average and standard deviation of three separate cultures. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Magnification; $\times 500$, $\times 4000$.

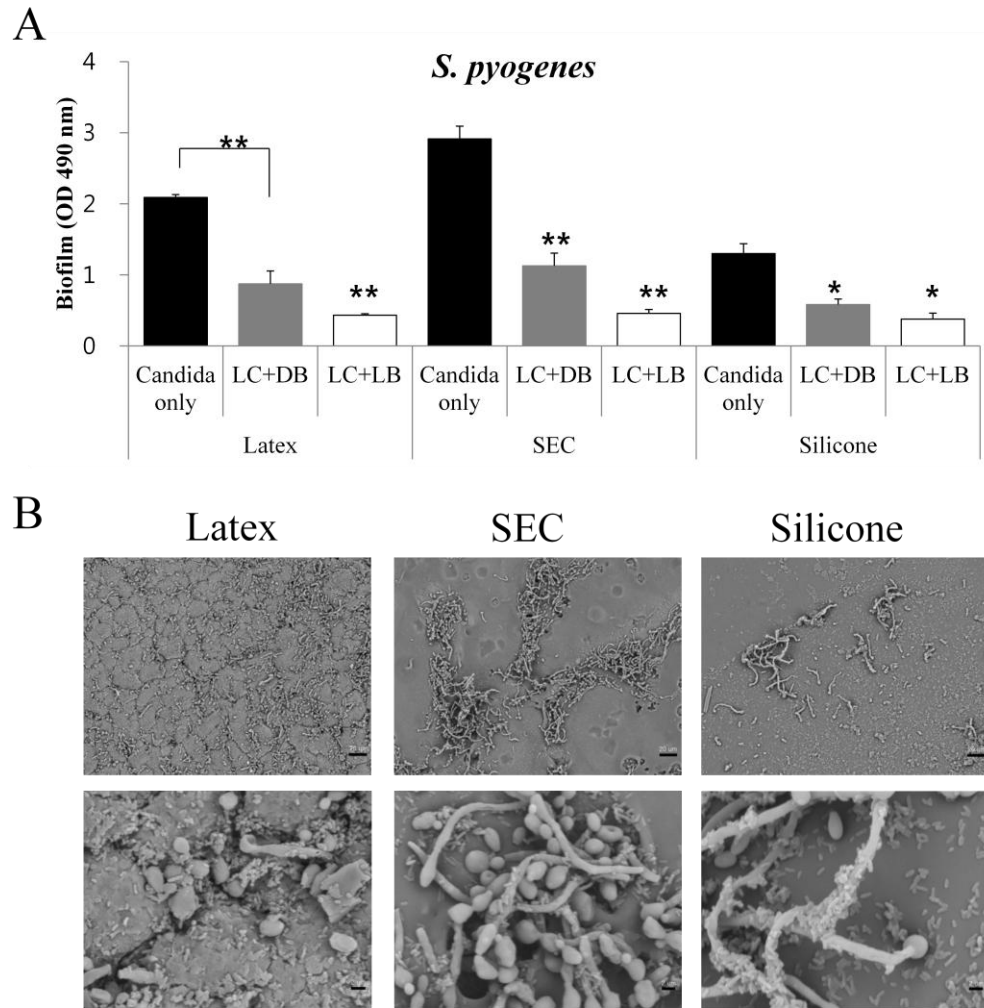


Figure 16. Effect of live and dead *S. pyogenes* presence on biofilm formation of *C. albicans* at different catheter materials. XTT reduction assay (A), SEM images (B). Mixed-species culture of *C. albicans* with live bacteria or dead bacteria were performed on three different catheters (latex, SEC, silicone). The data represent the average and standard deviation of three separate cultures. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Magnification; $\times 500$, $\times 4000$.

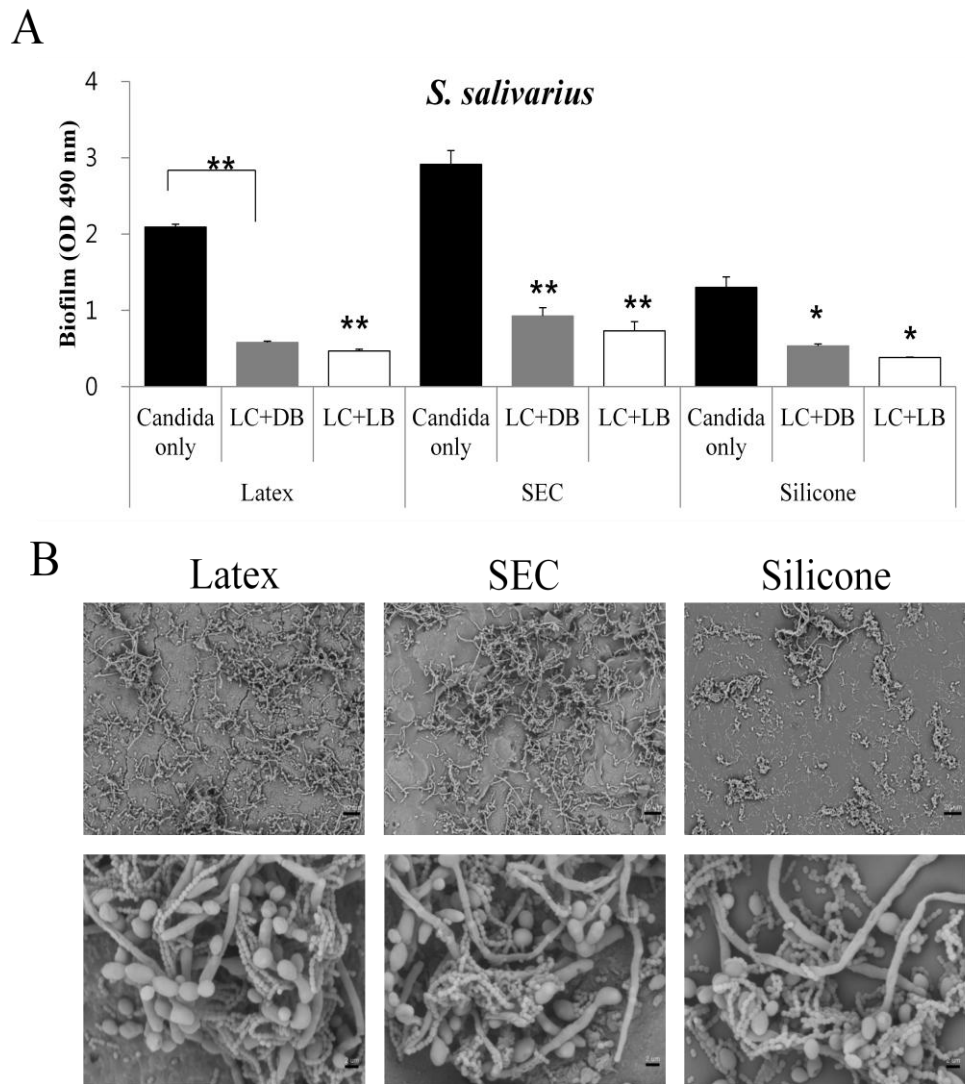


Figure 17. Effect of live and dead *S. salivarius* presence on biofilm formation of *C. albicans* at different catheter materials. XTT reduction assay (A), SEM images (B). Mixed-species culture of *C. albicans* with live bacteria or dead bacteria were performed on three different catheters (latex, SEC, silicone). The data represent the average and standard deviation of three separate cultures. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Magnification; $\times 500$, $\times 4000$.

4) 요카테터에서 *C. albicans* 단독, *C. albicans* 와 세균과의 복합 균주 배양 시 바이오필름의 구조

C. albicans 를 단독 배양했을 때 latex에서는 두께가 얇기는 하지만 재질 전반에 걸쳐 형성된 바이오필름이 관찰 되었고 SEC에서는 표면의 홈에 균들이 촘촘하게 박혀있는 양상으로 두꺼운 바이오필름이 확인 되었다. Silicone은 매끄러운 표면에 국소적으로 층이 얇은 바이오필름이 보였다 (Fig. 11).

C. albicans 와 각각의 세균을 함께 배양한 후 주사전자현미경으로 관찰하였다. Latex에서는 저배율로 보았을 때 *C. albicans* 를 단독 배양 시와 비교해보면 바이오필름의 두께가 얇으며 밀집도도 낮았고, 고배율로 보았을 때는 바이오필름의 *C. albicans* 사이 사이에 세균이 끼어있는 형태를 보였다. SEC 재질은 저배율에서는 바이오필름의 양이 전체적으로 감소하는 소견이나 고배율에서는 표면의 홈 내부에 여전히 균들이 촘촘하게 박혀있는 모습이 관찰되었다. Silicone에서는 *C. albicans* 를 단독 배양 시와 비교하여 저배율로 관찰했을 때는 바이오필름이 전체적으로 현저히 감소하였고 고배율에서는 *C. albicans* 사이 사이에 세균이 끼어있는 형태를 보였다 (Fig. 12 ~ 17).

IV. 고찰

C. albicans 는 삽입 의료 기구 표면이나 인체 점막 조직에 다른 세균과 함께 바이오필름을 형성하여 복합 균주 감염을 유발하는 가장 흔한 진균이다. 그래서 본 연구에서는 *C. albicans* 의 바이오필름 형성에 같이 존재하는 세균이 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다.

C. albicans 와 6종의 세균을 복합 균주 배양 했을 때 단독으로 *C. albicans* 만 배양한 것에 비해 *C. albicans* 의 바이오필름 형성이 감소하였다 (Fig. 2). 즉, 본 연구에서 세균은 모두 *C. albicans* 의 바이오필름 형성을 감소시켰으며 이는 바이오필름 형성능이 높은 *C. albicans* 163 균주에서 감소폭이 더 컸다.

C. albicans 와 세균간의 상호작용에 관한 기존의 연구들을 살펴 보면, 실험실 내 카테터 디스크 바이오필름 모델에서 *C. albicans* 의 존재가 *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) 증식을 촉진 시키는 것이 보고되었고, 또한 이 연구에서는 *S. epidermidis* 가 합성한 세포 외 중합체 기질이 항진균제인 fluconazole의 바이오필름 침투를 막고, *C. albicans* 가 있는 경우 항생제인 vancomycin 저항성이 높아져 두 균은 편리공생 관계임을 증명하기도 하였다.²³

반대로 *E. coli* 의 LPS (lipopolysaccharide, 지질다당질) 성분이 *Candida* 종의 바이오필름 형성을 억제한다는 보고도 있는데, 이 연구에서는 실험에 사용한 6가지 *Candida* 종마다, 바이오필름이 형성되는 시기마다 모두 결과가 다르기 때문에 molecular basis를 더 연구해야 할 것으로 결론을 내렸고 정확한 원인 물질은 밝혀진 바가 없었다.²⁴ 본 실험 연구에서는 *Candida* 종 중 임상적으로 가장 중요한 *C.*

albicans 으로 실험을 진행하였는데 *E. coli* 가 *C. albicans* 바이오필름 형성을 저하시키는 것을 확인하여 비슷한 결과를 얻었다.

또한 *P. aeruginosa* 를 *C. albicans* 와 함께 배양하면 *C. albicans* 의 바이오필름 형성을 저해하는데 그 기전은 *P. aeruginosa* 가 정족수 인식 물질 (퀴럼 센싱, quorum-sensing molecule)인 3-oxo-C12 homoserin lactone (3OC12HSL)을 분비하여 *C. albicans* 의 성장을 자체를 저하시키지는 않지만 군사형성과 연관된 유전자 발현을 억제하여 군사형 발달만 저해하는 것이라고 보고되기도 하였다.^{13,25} 이 결과는 본 연구와 유사한 결론으로 *P. aeruginosa*의 퀴럼 센싱 물질인 homoserin lactone처럼 다른 세균에서도 특정한 물질이 *C. albicans* 군사형성에 관여하는 유전자들을 억제하여 바이오필름 형성을 저하시키는 것으로 생각되어 각 세균마다 이 물질을 찾으려 앞으로 더 연구해야 할 것이다. 신호 전달 물질은 세균 중에서 이미 정족수 인식으로 알려진 것으로 미생물들이 이 것을 통해 서로 소통하는 능력을 가지며 주변 세포들의 밀집도를 인식한다고 밝혀져 있다.²⁶

C. albicans 는 farnesol과 tyrosol 두 가지 정족수 인식 물질이 알려져 있다. Farnesol은 바이오필름 내에서 군사 관련 유전자 발현을 억제함으로써 군사억제를 통해 바이오필름 형성을 제어한다.²⁷ Farnesol은 *P. aeruginosa* 의 퀴럼 센싱 물질인 homoserin lactone과 비슷한 C12 구조를 가지고 있고 바이오필름 내에서 유전자 발현 자체를 감소시켜 군사형성을 억제하고 효모형으로 돌아가게 만든다. Tyrosol은 더 최근에 발견된 것으로 *C. albicans* 세포 밀집도가 낮을 때 성장과 군사 형태 발생을 촉진한다.²⁸ Tyrosol과 바이오필름 형성에 관해서는 아직 알려진 바가 없다.

C. albicans 와 열처리로 죽인 사균체를 함께 배양한 경우에도 *C. albicans* 의 바

이오필름 형성이 감소하며, 생균보다는 감소 폭이 적지만 분명히 사균도 *C. albicans*의 바이오필름 형성을 억제한다 (Fig. 3). 이는 주사전자현미경 상 *C. albicans* 사이 사이에 사균이 끼어있는 형태를 보여 사균 입자가 바이오필름 발달 과정 중 구조에 영향을 주어 그 형성이 저하되는 것으로 사료된다. 위에서 언급한 세균과 진균 복합 배양한 연구에서는 사균체와 배양한 경우는 없었으며 실제 구조를 주사전자현미경으로 관찰 하지는 않았기 때문에 본 실험에서 중요한 단서를 얻은 것으로 생각한다.

사균체가 *C. albicans*의 바이오필름 형성을 억제하는 것으로 확인 되어 반대로 죽은 *C. albicans*가 세균의 바이오필름 형성에 미치는 영향을 알아보았을 때, 죽은 *C. albicans*와 함께 배양한 경우의 바이오필름 형성을 보는 O.D. 값은 세균 단독으로 배양한 경우와 유의한 차이가 없어 (Fig. 4), *C. albicans*의 바이오필름 형성에는 사균이 영향을 주지만 세균의 바이오필름 형성에는 죽은 *C. albicans*가 영향을 주지 않는다고 사료된다.

*C. albicans*를 단독 배양한 것과 각각의 세균을 함께 배양한 후에 형성되는 바이오필름의 구조를 주사전자현미경으로 확인하였다. *C. albicans*를 단독 배양한 것의 바이오필름은 밀집도가 높고 단단하며 여러층의 *C. albicans*가 관찰되었다. 그러나 각각의 세균을 함께 배양한 경우, 모두 바이오필름은 두께가 얇고 밀집도가 낮으며 *C. albicans* 사이 사이에 세균이 끼어있는 형태를 보이고 *C. albicans* 단독 배양한 것에 비해 현저히 균사체가 감소된 것이 관찰되었다 (Fig. 5). 또 *C. albicans*를 생균과 함께 배양한 경우가 사균에 비해 바이오필름 형성이 현저하게 감소되는 것이 관찰되었다 (Fig. 6). 따라서 세균 입자 자체가 바이오필름 형성을 억제하는 것에 더하여 세균이 증식, 성장하면서 합성하는 대사산물 등이 *C. albicans*의 바이오필름 형성에 영향

을 주는 것으로 추측되었다.

그래서 *C. albicans* 세포부착과 균사형성에 관련된 유전자 *SAP5*, *ALS3*, *ECE1*, *HWP1* 의 발현을 확인하였다. *SAP5* 는 secreted aspartyl proteinase 중 하나로 병원성 진균의 세포 외 단백질분해효소이다. 주로 *C. albicans* 에서만 잘 알려져 있고 실험 상 *C. albicans* 의 균사형성, 부착, 형질 변환 (phenotypic switching) 에 역할을 할 것으로 추정된다.²⁹ *ALS3* 는 agglutinin-like sequence 중 하나로 *C. albicans* 균사 형태 발생 시에 증가되어 있고 특히 바이오필름 형성에 중요하다고 알려져 있다.¹⁹ *HWP1* 은 hyphal wall protein 1으로 포유류의 점막에 cross-link하는 단백질의 일부 분으로 참여하는 것이 밝혀져 있으며 *C. albicans* 의 균사벽에 있는 자유로운 형식의 부착소 (adhesin)로서 바이오필름 발달 시 증가하여 부착에 공헌하는 것으로 알려져 있다.³⁰ *ECE1* 은 extent of cell elongation 1으로 아직 기능이 잘 알려지지 않은 single-pass membrane 단백을 전사 (encode)하는 유전자이다.³¹ *C. albicans* 가 효모형 일때는 발현되지 않고 균사를 형성하고 30분 후부터 발현되기 때문에 부착 기능이나 균사발달과 연관이 있을 것으로 추측하고 있다.¹⁹

*C. albicans*에서는 균사 형태와 균사 관련 유전자의 발현이 발병력에 매우 중요하다. *C. albicans*에서 균사 형성은 여러 기전에 의해 발병력이 촉진되는 데 첫째, 균사는 물리적인 힘을 이용해 상피층을 침범할 수 있고 둘째, 균사는 내피세포도 뚫거나 손상을 줄 수 있으며 셋째, 포식작용에 이어 균사 성장은 대식세포와 호중구를 용해시킬 수 있다.¹⁸

*C. albicans*와 그람 음성세균인 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*를 함께 배양한 경우 각 유전자들의 발현이 급격하게 감소하였다. 그람양성 세균인 *S. aureus*, *S.*

pyogenes, *S. salivarius*와 *C. albicans* 를 함께 배양한 경우, 그람음성 세균과 비교하여 발현량 감소폭이 낮기는 해도 역시 유전자의 발현이 감소하였다 (Fig. 8). 이는 세균이 *C. albicans* 의 효모 형태를 균사 형태로 변환시키는 유전자의 발현을 억제함으로써 *C. albicans* 의 바이오필름 형성을 억제하는 것으로 생각된다.

혹시 *C. albicans* 자체가 감소하여 RNA가 감소한 것인지 확인하기 위해 *C. albicans* 의 효모형과 관련된 유전자 발현을 측정하였다. 이 경우 효모형과 관련된 유전자 발현은 증가하는 것이 관찰 되어 *C. albicans* 자체가 감소하여 전체적인 유전자 발현이 감소한 것이 아님을 확인하였다.

C. albicans 와 각각의 사균체를 함께 배양한 후 *SAP5*, *ALS3*, *ECE1*, *HWP1* 유전자 발현을 확인 한 경우는 세포부착과 균사형성에 관련된 유전자 모두 발현에 큰 차이가 없었다 (Fig. 9). 이는 사균은 *C. albicans* 의 유전자 발현에 영향을 주어 바이오필름 형성을 억제하는 것이 아니라 주사전자현미경에서 관찰한대로 사균 입자 자체가 바이오필름 발달 과정 중 물리적으로 구조 형성을 억제하는 것으로 사료된다.

*C. albicans*는 삽입 의료 기구의 바이오필름 관련 감염 질환에서 가장 흔히 발견되는 진균으로 의료가 발전함에 따라 삽입 의료 기구 사용이 빈번해져서 이에 의한 질환 유도가 증가하고, 혈행이나 요로 감염의 경로를 따라 전신 혈행성 칸디다증으로 발전하면 치사율이 높아지므로 감염을 낮추기 위해 바이오필름 형성을 최소화 할 수 있는 재질의 연구가 많이 이루어지는 추세이다.¹⁴

기존의 연구에 의하면, *C. albicans* 의 경우 정맥관 재질인 polyvinyl chloride (PVC, 폴리염화비닐)와 비교하여 요카테터 재질인 latex와 SEC에서 바이오필름 형성이 증가되었고, 반대로 polyurethane (정맥관)과 100% silicone (요카테터)는 바이오

필름 형성이 감소하여, 접촉면의 화학적 성상이 *C. albicans* 바이오필름 형성에 영향을 준다고 알려져 있다.³² 세균의 바이오필름 형성에 여러 카테터 재질로 연구한 바는 많으나 진균과 세균이 복합 균주 감염된 카테터 연구는 거의 없고, 그나마 세균의 바이오필름 관련해서도 주로 혈행 감염을 보기 위한 정맥관 연관 연구가 주를 이루어 요카테터에 대한 고찰이 필요하다. 본 연구 상 plate에서는 *C. albicans*의 바이오필름 형성을 세균이 저해 하는 것으로 관찰되어 실제 의료기구 재질에서도 동일한 결과가 유추되는 지 실험 하기로 했다.

요로 감염은 병원 획득 감염 중 가장 많은 부분을 차지하며 대부분은 삽입 요카테터가 연관되어 있다.^{33,34} 이를 예방하기 위해서는 요카테터와 연결된 소변 주머니까지 완전 폐쇄 상태를 유지하여 감염원 완전 차단하는 것이 가장 효과적이지만 실제로는 매우 어려운 일이다. 최근 이러한 삽입 의료 기구 감염과 바이오필름 연관성이 널리 알려지면서 새로운 재질 개발이 이루어 지고 있는데 주로 항생제 주입 또는 살균 기능이 있다고 알려진 silver 주입 요카테터로, 항생제 성분인 gentamicin, nitrofurazone 주입 요카테터와 silver hydrogel 주입 요카테터와 비교했을 때 항생제 성분 주입 요카테터에서 유의하게 바이오필름 형성과 세균노가 감소함을 보고하였다.^{35,36} 이처럼 실험실 상에서는 바이오필름 억제 효과가 있었지만 실제 대규모 임상 연구에서는 1주일 미만의 단기간 사용시에만 세균노 발병 감소 효과가 있고 7일 이후에는 일반 silicone 요카테터와 비교시 통계적인 유의성이 없었다.³⁷ 즉, 1주일 이상 사용시에는 가격이 비싼 항생제나 살균기능이 주입된 요카테터도 요로 감염 예방 효과가 적다는 것이다. 그런 이유 때문에 비용에 비해 효과적이지 않아 항생제나 살균 기능이 주입된 요카테터를 현재 임상에서는 거의 사용하지 않는다. 그래서 본 연

구에서는 실제 임상에서 쓰는 요카테터 3가지 - latex, SEC, 100% silicone - 로 바이오필름 형성 실험을 하였다. Latex 재질은 천연고무성분으로 값이 싸고 둥근 모양으로 만들었을 때 저항성과 회복력, 장력이 좋아 널리 쓰였지만 장기간 사용시 감염이 쉽게 되며 요산에 의해 외피막이 형성되어 결석, 요도 협착 등 부작용이 생기는 단점이 있다. 그리고 사람에 따라 latex allergy가 있어 심하게는 호흡곤란, 쇼크상태를 유발 할 수도 있다.³⁸ Silicone은 위와 같은 latex의 단점이 없지만, 경성의 재질 성상으로 환자에게 불편함을 준다. 이런 배경으로 위 두 재질의 장점을 취할 목적으로 천연 latex 표면에 silicone을 열가소성 탄성체 (elastomer) 형태로 가공하여 씌운 (coating) SEC가 개발되었다. 하지만 coating 재질은 표면에 흠이 생기면서 미세하게 갈라져 거친 표면을 형성하며 세균이 잘 달라붙는 환경이 조성 되기도 한다.³⁹ 본 연구에서도 이를 확인하였는데, 균 배양 실험을 하기 전 각 재질 표면을 주사전자현미경으로 관찰하였을 때 SEC는 개발 이론과 달리 latex 표면에 silicone으로 매끈하게 코팅이 되어있지 않고 흠처럼 파인 곳이 많았다. 그 외 Latex는 표면에 요카테터 모양으로 성형을 하면서 생긴 물결모양의 주름이 보였으며 silicone은 표면이 아주 매끈했다 (Fig. 10).

C. albicans 를 단독 배양하여 주사전자현미경으로 관찰했을 때 latex에서는 재질 전반에 걸쳐 얇은 바이오필름이 형성되었고 SEC에서는 표면의 흠에 균들이 촘촘하게 박혀있는 양상으로 두꺼운 바이오필름을, silicone은 매끄러운 표면에 층이 얇은 바이오필름이 국소적으로만 보여 XTT assay 결과와 일치하는 양상을 보였다 (Fig. 11).

요카테터 표면에 다른 세균과 복합 배양했을 때도 96-well microtiter plate 연구 때와 동일하게 생균과 배양 시 현저한 바이오필름 감소 소견이 보였고 사균과 배양

시에도 *C. albicans* 를 단독으로 배양한 것에 비해 감소하였지만 생균 보다는 감소 폭이 적었다. 재질 별로 분석 했을 때도 전반적으로 *C. albicans* 단독 배양한 경우와 비슷하게 SEC의 바이오필름 형성이 가장 높았고 latex, silicone 순 이었다. 주사전자 현미경 관찰 시, *C. albicans* 와 각각의 세균을 함께 배양한 경우 latex, SEC, silicone 모두 형성된 바이오필름이 *C. albicans* 사이 사이에 세균이 끼어있는 형태를 보이고 바이오필름의 두께가 얇으며 밀집도도 낮았다. 하지만 SEC의 경우 고배율에서는 표면의 홈에 여전히 균들이 촘촘하게 박혀있는 모습이 관찰되어 여전히 균이 많을 것으로 생각되었다 (Fig. 12 ~ 17).

현재 임상에서는 일회성 방광 배액 (벨라톤) 시에는 가격이 싼 latex를 사용하며 2일 이상 요카테터 삽입이 필요한 경우 대부분 silicone을 사용하지만 재질이 딱딱하여 불편감을 호소하는 환자에서는 SEC를 많이 사용하고 있다. 하지만 SEC는 코팅재질 표면의 홈에 바이오필름이 두껍게 형성 되는 본 연구 결과상, 요로 감염 이환율을 낮추는 결과를 얻는데 SEC 사용이 효과적이지 않을 수 있음을 보여준다.

본 연구의 의의는 *C. albicans* 와 6종의 세균을 각각 복합 균주 배양 했을 때 단독으로 *C. albicans* 만 배양한 것에 비해 *C. albicans* 의 바이오필름 형성이 감소한 것을 측정하였고 열처리로 죽인 사균과도 복합 균주 배양 후 주사전자현미경으로 구조를 관찰하여 그 기전이 세균 입자 자체가 물리적으로 바이오필름 구조 형성을 억제하고, *C. albicans* 의 군사형성에 관여하는 유전자 발현을 억제하기 때문으로 밝혀낸 것이다. 본 연구의 제한점으로는 실험실 내, 즉 *In vitro* 상태에서만 연구를 진행하여 주변 환경에 영향을 많이 받는 바이오필름 형성이 실제 임상에서 볼 수 있는 *In vivo* 에서 동일한 결과를 예상하기는 어렵다는 점이다. 또, 각 세균 마다 어떤 특정한 물질

이 *C. albicans* 균사형성에 관여하는 유전자들을 억제하여 바이오필름 형성을 저하시키는지 앞으로 더 연구해야 할 것이다.

V. 결론

세균은 *C. albicans* 의 바이오필름 형성을 저해하며 이 기전은 세균이 *C. albicans* 의 군사체 형성에 관계하는 유전자 발현을 억제하며, 세균체가 *C. albicans* 의 바이오필름 발달 과정 중 물리적으로 구조 형성을 억제하는 것으로 사료된다.

실제 임상에서 사용하는 요카테터에 같은 실험을 시행했을 때 96-well microtiter plate와 동일하게 6종의 세균 모두 *C. albicans* 의 바이오필름 형성을 억제하였고 생균이 사균보다 억제효과가 더 큰 것으로 나타났다. 3가지 요카테터에서 모두 비슷한 양상을 보였고, 요카테터 재질 간 비교 시에는 100% silicone 재질이 가장 바이오필름 형성이 적었으며 latex보다 SEC에 바이오필름 형성이 잘 되었다. 이는 silicone coating이 이론과는 달리 표면에 홈을 형성되면서 그 곳으로 균들이 부착하여 바이오필름 형성이 촉진되는 것으로 보인다. 따라서 감염 측면에서 보자면 다른 재질 보다 silicone 재질의 요카테터를 선택하는 것이 바람직하다고 사료된다.

향후 이런 결과를 바탕으로 *C. albicans* 의 바이오필름 제어 방법 개발 및 항진균제 개발에 세균의 유전자 발현 억제 기전을 이용할 수 있지 않을까 기대한다. 병원 내 감염의 주요 원인균인 *C. albicans* 의 바이오필름 형성이 효과적으로 억제되면 동반되는 복합 균주 감염도 감소하며 삽입 의료 기구 관련 감염도 줄어들어 환자의 이환율과 사망률 감소는 물론, 의료비 감면에 큰 기여를 하리라 생각한다.

참고문헌

1. Nett J, Andes D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. Curr Opin Microbiol, 2006; 9: 340-345.
2. Moon SM, Park KH, Kim YS, Woo JH. *Candida albicans* Biofilm Formation and Pathophysiology. Kor J Med Mycol 2010; 15(3): 116-123.
3. Lynch AS, Robertson GT. Bacterial and Fungal Biofilm Infections. Annu Rev Med 2008; 59: 455-466.
4. Thein Zm, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms; a mini review. Mycoses, 2009; 52: 467-475.
5. Sundstrom P. Adhesion in *Candida spp.* Cellular Bicrobiol 2002; 4: 461-469.
6. Hostetter MK. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candidia spp.* with epithelial and endothelial surfaces. Clin Microbiol Rev 1994; 7: 29-42.
7. Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. Microbiology 2001; 147(8): 1997-2005.
8. Gow NA, Brown AJ, Odds FC, Fungal morphogenesis and host invasion. Curr Opin Microbiol 2002; 5: 366-371.
9. Park SJ, Choi SJ, Shin WS, Lee HM, Lee KS, Lee KH. Relationship between biofilm formation ability and virulence of *Candida albicans*. J Bacteriol Virol 2009; 39: 119-124.
10. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCORMICK T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. J Bacteriol 2001; 183(18): 5385-5394.

11. Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function, and expression. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62(1): 130–180.
12. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 255–267.
13. Hogan DA, Vik A, Kolter R. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. Mol Microbiol 2004; 54(5): 1212–1223.
14. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. Clin Microbiol Rev 2004; 17(2): 255–267.
15. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Science 1999; 284: 1318–1322.
16. Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. Trends in Microbiol 2011; 19(11): 557–563.
17. Hansen SK, Rainey PB, Haagenzen JA, Molin S. Evolution of species interactions in a biofilm community. Nature 2007; 445: 533–536.
18. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* species. Eukaryotic Cell 2011; 10(9): 1173–1182.
19. Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. Cellular Microbiology 2006; 8(9): 1382–1391.
20. Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, Smith FJ, Yue F, Phan QT, Edwards JE, Filler SG, Mitchell AP. Critical role of Bcr1-Dependent adhesins in *C. albicans* Biofilm formation In Vitro and In Vivo. PLoS pathogens 2006; 2: 636–649.
21. Merle V, Germain JM, Bugel H, Nouvellon M, Lemeland JF, Czernichow P,

- Grise P. Nosocomial Urinary Tract Infections in Urology Patients: Assessment of a Prospective Surveillance Program Including 10,000 Patients. *European Urology* 2002; 41: 483-489.
22. Song SY, Lee JY, Koh JS, Ghil SH, Lee SS, Jung HT, Peck KR. Long-term Effects of Antibiotic-coated Foley Catheter on Bacterial Biofilm Formations. *Korean J Urol* 2005; 46: 730-736.
 23. Adam B, Baillie GS, Douglas J. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 2002; 51: 344-349.
 24. Bandara HM, Yau JY, Watt RM, Jin LJ, Samaranayake LP. *Escherichia coli* and its lipopolysaccharide modulate *in vitro* *Candida* biofilm formation. *J Med Microbiol* 2009; 58: 1623-1631.
 25. Hogan DA, Kolter R. *Pseudomonas-Candida* interaction: An Ecological role for Virulence Factors. *Science* 2002; 296: 2229-2232.
 26. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* 1998; 280: 295-298.
 27. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, López-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* Biofilm formation by Farnesol, a Quorum-Sensing molecule. *Appl and environ Microbiol* 2002; 68(11): 5459-5463.
 28. Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *PNAS* 2004; 101(14): 5048-5052.
 29. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiol and Mol Biol Rev* 2003; 67(3): 400-428.

30. Staab JF, Bahn YS, Tai CH, Cook PF, Sundstrom PS. Expression of Transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* Germ tube through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal Glycosylphosphatidylinositol Modification. J of Biol chem 2004; 278(39): 40737-40747.
31. Birse CE, Irwin MY, Fonzi WA, Sypherd PS. Cloning and Characterization of *ECE1*, a Gene Expressed in Association with Cell Elongation of the Dimorphic Pathogen *Candida albicans*. . Infect Immun 1993; 61: 3648-3655.
32. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* Species on the surface of catheter materials In Vitro. Infect Immun 1994; 62(3): 915-921.
33. Weinstein JW, Mazon D, Pantelick E. A decade of prevalence surveys in a tertiary-care center: trends in nosocomial infection rates, device utilization, and patient acuity. Infect Control Hosp Epidemiol. 1999; 20(8): 543-548.
34. Richards M, Edwards J, Culver D, Gaynes R. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. Infect Control Hosp Epidemiol. 2000; 21: 510-515.
35. Hachem R, Reitzel R, Borne A, Jiang Y, Tinkey P, Uthamanthil R, Chandra J, Ghannoum M, Raad I. Novel antiseptic urinary catheters for prevention of urinary tract infections: Correlation of In Vivo and In Vitro Test Results. Antimicrobial agents and chemotherapy 2009; 53(12): 5145-5149.
36. Desai DG, Liao KS, Cevallos ME, Trautner BW. Silver or Nitrofurazone impregnation of urinary catheters has a minimal effect on uropathogen adherence. J of urology 2010; 184: 2565-2571.
37. Schumm K, Lam TB. Types of urethral catheters for management of short-

- term voiding problems in Hospitalized adults: A short version Cochrane review. *Neurourology and urodynamics* 2008; 27: 738-746.
38. Belfield PW. Everyday aids and applicnaces: urinary catheters. *British medical J* 1988; 296: 836-837.
39. Lawrence EL, Turner IG. Materials for urinary catheters: a review of their history and development in the UK. *Med engineering & physics* 2005; 27: 443-453.

Abstract

Influence of Bacterial Presence on Biofilm formation of *Candida albicans*

Kyoung-Hee Han

Dep. of Medicine

The Graduate School

Yonsei University

Biofilms are organized communities of microorganism in which cells covered with extracellular polymeric substances attach to biotic or abiotic surfaces. Biofilms can cause both persistent infection and indwelling medical device-associated infection. *Candida albicans* (*C. albicans*) is identified as one of the most prevalent human fungal pathogens.

The aim of this study was to examine the influence of bacterial presence on biofilm formation of *C. albicans*, a well-known major virulence factor.

To assess the role of the biofilm formation of *C. albicans*, we monitored the formation of biofilm in three different cultures: bacteria, *C. albicans*, and mixed-species culture containing both bacteria and *C. albicans*. Also, to examine whether the bacteria itself affects the role of biofilm formation or other mechanisms, heat-killed, dead bacteria were cultured in the mixed-species medium. Scanning electron microscope (SEM) was used to determine the structure of the biofilm,

and real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to amplify and quantify hypha-associated genes (*SAP5*, *ALS3*, *ECE1*, *HWPI*). The formation of biofilms (by *C. albicans* alone or in mixed-species culture containing both bacteria and *C. albicans*) in three different types of urethral catheters were assessed using XTT assay and SEM. *C. albicans* cultured with bacteria had a decreased ability to form biofilm than when cultured alone. Results showed a 50 ~ 80% decrease of biofilm formation in *C. albicans* cultured with dead bacteria.

In a mixed-species culture, bacteria were found in between the hyphae and yeast form of *C. albicans*, and the biofilm was thin with low density and significantly decreased hyphae formation. Compared with *C. albicans* cultured alone, *C. albicans* cultured for 24 hours with other bacteria had significantly decreased genetic expressions of *SAP5*, *ALS3*, *ECE1*, *HWPI*.

In conclusion, bacteria have a negative effect on the formation of biofilm by *C. albicans*. This mechanism is the result of the suppression of genes associated with hyphae production of *C. albicans* and bacteria particles physically affected the biofilm architecture and biofilm formation. Similar results were also found in the experiment with urethral catheters used in clinical settings, with catheters made up 100% silicone having the least biofilm formation.

Key words : *Candida albicans*, Biofilm, Bacterial interaction, Urethral catheter.